



Laura Gomes Fidalgo

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Desenvolvimento de um gelado com características funcionais à base de microalgas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientador: Maria Fernanda Guedes Pessoa, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Luísa Maria Rodrigues Gouveia da Silva, Investigadora Sénior, Laboratório Nacional de Energia e Geologia – Unidade de Bioenergia

Júri:

Presidente: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Prof. Auxiliar com Agregação – FCT/UNL

Arguente: Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro, Prof.^a Adjunta do Instituto Politécnico de Leiria

Vogal: Doutora Luísa Maria Rodrigues Gouveia da Silva, Investigadora Sénior do Laboratório Nacional de Energia e Geologia



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2018

Laura Gomes Fidalgo

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Desenvolvimento de um gelado com características funcionais à base de microalgas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientador: Maria Fernanda Guedes Pessoa, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Luísa Maria Rodrigues Gouveia da Silva, Sénior Investigadora, Laboratório Nacional de Energia e Geologia – Unidade de Bioenergia

Júri:

Presidente: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Prof. Auxiliar com Agregação – FCT/UNL

Arguente: Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro, Prof.^a Adjunta do Instituto Politécnico de Leiria

Vogal: Doutora Luísa Maria Rodrigues Gouveia da Silva, Investigadora Sénior do Laboratório Nacional de Energia e Geologia

Desenvolvimento de um gelado com características funcionais à base de microalgas

Copyright © Laura Gomes Fidalgo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A realização da presente Dissertação de Mestrado só foi possível devido ao incansável apoio e diversos contributos de várias pessoas, ao longo dos meses de trabalho, pelo que gostaria de deixar expresso o meu eterno agradecimento:

Primeiramente, à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, que foi a minha casa durante os últimos 5 anos. À Professora Doutora Maria Fernanda Pessoa, minha orientadora, por se ter entusiasmado com o meu interesse por estes microrganismos bestiais que são as microalgas, por ter possibilitado a realização deste trabalho, por toda a disponibilidade demonstrada durante o mesmo, e por todo o conhecimento científico que me passou. O seu entusiasmo é contagiante e incentivador de novas ideias, e a sua exigência levou-me a esforçar-me por ser cada vez melhor. Agradeço, ainda, ao Professor Doutor Fernando Reboredo, por estes 2 anos enquanto Coordenador de Mestrado, por todas as conversas, trocas de ideias, e correções feitas, que me levaram a produzir este trabalho, bem como ao Professor Doutor Fernando Lidon, por todo o apoio prestado no que toca a equipamento, pelo conhecimento sobre a agro-indústria, e por me apresentar a realidade do que é a indústria alimentar.

Agradeço ao Laboratório Nacional de Energia e Geologia, na pessoa da Doutora Luísa Gouveia, por ter aceitado orientar o meu trabalho, relativamente à tecnologia de produção de microalgas, por ter mostrado um contagiante entusiasmo quando apresentámos a ideia, e por toda a ajuda e conhecimento científico que me transmitiu. Obrigado por me ter aberto as portas do laboratório de bioenergia, para poder realizar as análises necessárias ao sucesso do meu trabalho que, de outra forma, dificilmente seriam conseguidas. Aproveito para agradecer, e muito, à Alice e à Graça, duas pessoas maravilhosas e incansáveis, que me acolheram, ajudaram e orientaram nos dias que passei no LNEG.

Quero, também, agradecer às minhas colegas e amigas Maria João Primitivo, Catarina Brito e Sofia Santoalha e Liliana Santos, que me acompanharam nesta aventura que foi o mestrado. Com vocês tornou-se tudo mais fácil e foi um prazer partilhar estes dois anos com pessoas como vocês.

Agradeço, também, a todos os meus amigos, aos de sempre e às amizades mais recentes, por terem estado ao meu lado durante todo este processo, por conseguirmos arranjar sempre um momento para pôr a conversa em dia e desanuviar, e por me incentivarem a continuar quando tudo parecia complicar-se. Tenho de agradecer especialmente ao André Pedrinho, à Mariana Costa, e à Cláudia Almeida, pelo papel que desempenham na minha vida. A vocês os três, um obrigado não chega.

Por fim, e não menos importante, agradeço à minha família que é a base da minha vida e da minha pessoa. Em particular, agradeço imenso aos meus pais por me apoiarem em tudo, por me terem educado como o fizeram, e por me ajudarem, todos os dias, a tornar-me na minha melhor versão. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo nas alturas em que eu não o fiz, e espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram, e fazem, por mim. Todo o meu trabalho é para vocês.

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

RESUMO

A realidade alimentar da atualidade é muito diferente da que se conhecia num passado recente. Os consumidores já não procuram alimentos que apenas os saciem e ofereçam nutrientes e energia, mas sim produtos alimentares mais completos, com comprovados benefícios para a saúde e que reduzam o risco de várias doenças, ou seja, alimentos funcionais. Este tipo de produtos apresenta-se como um mercado em rápido crescimento, devido não só à pressão por parte dos consumidores, mas também resultante da inovação da tecnologia alimentar. Estudos científicos revelam que as microalgas são extremamente ricas nutricionalmente, além de possuírem uma grande plasticidade ambiental, tendo a capacidade de se adaptarem a mudanças das condições do meio.

O presente trabalho pretendeu estudar a tecnologia de produção de duas espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris* Kessler & Huss, 1992 e *Porphyridium purpureum* (Bory) K. M. Drew & R. Ross, 1965) em ambiente controlado, para posterior incorporação num gelado em diferentes concentrações, avaliando o perfil nutricional e sensorial das formulações desenvolvidas.

Foram realizadas diversas análises à biomassa microalgal e às formulações de gelado desenvolvidas, nomeadamente à cor, através de uma análise colorimétrica, ao teor em proteínas, açúcares e lípidos totais, bem como aos elementos minerais e teor de sólidos totais. As culturas de microalgas foram, ainda, sujeitas a processos de espectrofotometria e microscopia ótica, monitorizando o seu crescimento e pureza. Após produção de cada formulação de gelado, estas foram sujeitas a análise sensorial hedónica.

Os resultados mostram que as culturas permaneceram puras ao longo do ensaio. Em relação aos teores dos macroconstituintes das microalgas, estes aproximam-se dos presentes na literatura científica.

No final do estudo concluiu-se que a tecnologia de produção de microalgas foi bem aplicada, tendo-se produzido biomassa de qualidade e rica em minerais. Constatou-se que o produto desenvolvido é extremamente rico em minerais, e que se encontra dentro dos interesses dos consumidores, tendo recebido uma boa aceitação por parte dos painéis de prova. É de referir que este tipo de produtos é digno de investigação, visto que a procura por alimentos saudáveis, funcionais e enriquecidos é cada vez maior.

Palavras-chave: alimentação funcional; microalgas; *Chlorella vulgaris*; *Porphyridium purpureum*; gelado funcional.

ABSTRACT

Today's reality, concerning food and alimentation, is very different from what was known in a recent past. Consumers are no longer looking for foods that only satisfy them and offer nutrients and energy, but more complete food products with proven health benefits and that reduce the risk of various diseases. This type of product is called "functional food" and presents itself as a rapidly growing market, due not only to pressure from consumers but also resulting from the innovation of food technology. Scientific studies show that microalgae are extremely rich in nutrients and have a high environmental plasticity, and also the ability to adapt to changing environmental conditions.

The present work aimed to study the production technology of two microalgae species (*Chlorella vulgaris* Kessler & Huss, 1992 and *Porphyridium purpureum* (Bory) KM Drew & R. Ross, 1965) in a controlled environment for subsequent incorporation into ice cream in different concentrations, evaluating the nutritional and sensorial profile of the developed formulations.

Several analyzes were carried out on the microalgal biomass and the developed ice-cream formulations, namely the color, through a colorimetric analysis, the total proteins, sugars and lipids content, as well as the mineral elements and total solids content. Microalgae cultures were also subjected to spectrophotometry and optical microscopy, monitoring their growth and purity. After production of each ice cream formulation, they were subjected to hedonic sensory analysis.

The results show that the cultures remained pure throughout the trial. In relation to the contents of the micro-algae macro-constituents, these are close to those present in the scientific literature.

At the end of the study it was concluded that microalgae production technology was well applied, producing quality biomass, rich in minerals. It was found that the final product developed is extremely rich in minerals, and that it is within the interests of the consumers, receiving a good acceptance on the part of the test panels. It should be noted that this type of product is worthy of investigation as the demand for healthy, functional and enriched food is increasing.

Keywords: functional foods; microalgae; *Chlorella vulgaris*; *Porphyridium purpureum*; functional ice cream.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ALIMENTAÇÃO FUNCIONAL.....	1
1.2. MICROALGAS.....	3
1.2.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	5
1.2.2. <i>Porphyridium purpureum</i>	6
1.3. GELADO.....	7
2. METODOLOGIA.....	9
2.1. MICROALGAS.....	9
2.1.1. MATÉRIA-PRIMA.....	9
2.1.2. MONITORIZAÇÃO DAS CULTURAS.....	10
a) COLORIMETRIA.....	10
b) MICROSCOPIA ÓTICA.....	12
2.1.3. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL.....	12
a) ESPETROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR.....	12
b) ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS.....	13
c) TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS DE BIOMASSA MICROALGAL	
HÚMIDA.....	14
d) LIOFILIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	15
e) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES TOTAIS.....	15
f) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM PROTEÍNAS TOTAIS.....	16
g) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM LÍPIDOS TOTAIS.....	18
h) TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS DE BIOMASSA MICROALGAL	
LIOFILIZADA.....	19
2.2. GELADO.....	20
2.2.1. FORMULAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTAR.....	20
2.2.2. ANÁLISE DA COR DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS.....	22
2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS.....	22
a) ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS.....	22

b)	<i>DETERMINAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES TOTAIS</i>	22
c)	<i>DETERMINAÇÃO DO TEOR EM PROTEÍNAS TOTAIS</i>	23
d)	<i>DETERMINAÇÃO DO TEOR EM LÍPIDOS TOTAIS</i>	24
2.2.4.	<i>ELABORAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL</i>	25
2.2.5.	<i>ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA</i>	25
2.2.6.	<i>ELABORAÇÃO DO PERFIL SENSORIAL</i>	26
2.2.7.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	26
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1.	<i>MICROALGAS</i>	27
3.1.1.	<i>MONITORIZAÇÃO DAS CULTURAS</i>	27
3.1.2.	<i>CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL</i>	29
3.2.	<i>GELADO</i>	36
3.2.1.	<i>ANÁLISE DA COR DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS</i>	36
3.2.2.	<i>CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS</i>	38
3.2.3.	<i>ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA</i>	45
4.	CONCLUSÃO	51
5.	PERSPETIVAS FUTURAS	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
7.	ANEXOS	63
	ANEXO 1 – REAGENTES E EQUIPAMENTOS	63
	ANEXO 2 – MEIOS DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS	67
	ANEXO 3 – SOLUÇÕES PRESENTES NOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE MACROCONSTITUINTES	68
	ANEXO 4 – FICHA DE PROVA: ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA.....	69
	ANEXO 5 – PERFIL SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - ILUSTRAÇÃO DE UMA CÉLULA CHLOROPHYTA. ADAPTADO (LEE, 2008).	6
FIGURA 1.2 - ILUSTRAÇÃO DE UMA CÉLULA RHODOPHYTA. ADAPTADO (LEE, 2008).	7
FIGURA 2.1 - FOTOGRAFIAS DA MONTAGEM EXPERIMENTAL DAS CULTURAS DE MICROALGAS; A - CULTURA DE <i>C. VULGARIS</i> NUMA FASE INICIAL; B - CULTURA DE <i>P. PURPUREUM</i> NUMA FASE INICIAL; C - CULTURAS DE AMBAS AS ESPÉCIES NUMA FASE FINAL.	10
FIGURA 2.2 - FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO (COLORÍMETRO) UTILIZADO PARA ANÁLISE COLORIMÉTRICA.	10
FIGURA 2.3 - COR REPRESENTADA GRAFICAMENTE. ADAPTADO (LOSKOTOVA, N.D.).	11
FIGURA 2.4 - FOTOGRAFIA DO APARELHO PORTÁTIL DE RADIAÇÃO-X EM FUNCIONAMENTO.	13
FIGURA 2.5 - FOTOGRAFIA DE PLACAS DE PETRI COM BIOMASSA LIOFILIZADA; A - <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; B - <i>PORPHYRIDIVUM PURPUREUM</i>	15
FIGURA 2.6 - FOTOGRAFIA DO GRADIENTE DE COR TÍPICO DO MÉTODO UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES.	16
FIGURA 2.7 - FOTOGRAFIA DO GRADIENTE DE COR TÍPICO DO MÉTODO UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR EM PROTEÍNAS.	18
FIGURA 2.8 - ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR EM LÍPIDOS. A - SOLUÇÃO BIFÁSICA; B - ÓLEO EXTRAÍDO DE <i>C. VULGARIS</i> ; C - ÓLEO EXTRAÍDO DE <i>P. PURPUREUM</i>	19
FIGURA 2.9 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DO GELADO DE NATA CONTROLO; PRIMEIRA FORMULAÇÃO.	21
FIGURA 3.1 - FOTOGRAFIAS DAS CULTURAS DE MICROALGAS, COM AMPLIAÇÃO A=500X, TIRADAS ATRAVÉS DO MICROSCÓPIO ÓTICO, EM 2 TEMPOS DE CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES (DIA 0 E DIA 35). A - <i>C. VULGARIS</i> TEMPO 0; B - <i>P. PURPUREUM</i> TEMPO 0; C - <i>C. VULGARIS</i> TEMPO 35; D - <i>P. PURPUREUM</i> TEMPO 35.	29
FIGURA 3.2 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DO ESPETRO DE ABSORÇÃO DA CULTURA DE <i>C. VULGARIS</i> NO DIA 0 DE CULTURA. ABS – ABSORVÂNCIA MEDIDA; NM – COMPRIMENTO DE ONDA.	30
FIGURA 3.3 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DO ESPETRO DE ABSORÇÃO DA CULTURA DE <i>C. VULGARIS</i> NO DIA 35 DE CULTURA. ABS – ABSORVÂNCIA MEDIDA; NM – COMPRIMENTO DE ONDA.	30
FIGURA 3.4 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DO ESPETRO DE ABSORÇÃO DA CULTURA DE <i>P. PURPUREUM</i> NO DIA 0 DE CULTURA. ABS – ABSORVÂNCIA MEDIDA; NM – COMPRIMENTO DE ONDA.	31
FIGURA 3.5 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DO ESPETRO DE ABSORÇÃO DA CULTURA DE <i>P. PURPUREUM</i> NO DIA 35 DE CULTURA. ABS – ABSORVÂNCIA MEDIDA; NM – COMPRIMENTO DE ONDA.	32
FIGURA 3.6 - FOTOGRAFIA DA PREPARAÇÃO DAS VÁRIAS FORMULAÇÕES DE GELADOS COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL (<i>C. VULGARIS</i> E <i>P. PURPUREUM</i>) PARA ANÁLISE COLORIMÉTRICA; A - PRIMEIRA FORMULAÇÃO (N1, C1 E P1); B - SEGUNDA FORMULAÇÃO (CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL SUPERIOR) (N2, C2 E P2).	38
FIGURA 3.7 – EXEMPLOS DE POSSÍVEIS RÓTULOS PARA OS GELADOS CONCEBIDOS (N1,2 – GELADO NATA CONTROLO; N2 – GELADO DE NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; C1,2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; C1 – 5 ML DE BIOMASSA/C2 – 10 ML DE BIOMASSA E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; P1,2 - GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> ; P1 – 10 ML DE BIOMASSA/P2 – 20 ML DE BIOMASSA E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR).	44
FIGURA 3.8 - GRÁFICOS ILUSTRATIVOS DO PERFIL SENSORIAL DE CADA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA AGRUPADOS PARA COMPARAÇÃO (A: N1 – GELADO NATA CONTROLO; C1 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 5 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; P1 - GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> ; B: N2 – GELADO NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; C2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> E	

REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; P2 - GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 20 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR).....	46
FIGURA 7.1 - FICHA DE PROVA CRIADA PARA ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA DAS VÁRIAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	69
FIGURA 7.2 - GRÁFICOS ILUSTRATIVOS DO PERFIL SENSORIAL DE CADA UMA DAS PRIMEIRAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	70
FIGURA 7.3 - GRÁFICOS ILUSTRATIVOS DO PERFIL SENSORIAL DE CADA UMA DAS SEGUNDAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS PARÂMETROS MEDIDOS NA ANÁLISE COLORIMÉTRICA, NO TEMPO 0 (0 DIAS) E NO TEMPO 35 (35 DIAS) DE CULTURA, CORRESPONDENTES À ESPÉCIE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ; L* - LUMINOSIDADE (PRETO-BRANCO); A* - VERDE-VERMELHO; B* - AZUL-AMARELO; C* - SATURAÇÃO; H° - TONALIDADE; DP – DESVIO-PADRÃO; AS LETRAS DIFERENTES (A – B) EM CADA LINHA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO PARÂMETRO NO TEMPO.	27
TABELA 3.2 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS PARÂMETROS MEDIDOS NA ANÁLISE COLORIMÉTRICA, NO TEMPO 0 (0 DIAS) E NO TEMPO 35 (35 DIAS) DE CULTURA, CORRESPONDENTES À ESPÉCIE <i>PORPHYRIDIVUM PURPUREUM</i> ; L* - LUMINOSIDADE (PRETO-BRANCO); A* - VERDE-VERMELHO; B* - AZUL-AMARELO; C* - SATURAÇÃO; H° - TONALIDADE; DP – DESVIO-PADRÃO. AS LETRAS DIFERENTES (A – B) EM CADA LINHA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO PARÂMETRO NO TEMPO.	28
TABELA 3.3 - VALORES MÉDIOS \pm DP DA QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS MINERAIS, PELO MÉTODO XRF, DAS DUAS ESPÉCIES DE MICROALGAS; OS ELEMENTOS MINERAIS ENCONTRAM-SE EM MG/100G DE MATÉRIA HÚMIDA; CA – CÁLCIO; K – POTÁSSIO; P – FÓSFORO; CL – CLORO; S – ENXOFRE; MG – MAGNÉSIO; SI – SILÍCIO; FE – FERRO; SE – SELÊNIO; ZN – ZINCO; CU – COBRE; CR – CRÓMIO; NI – NÍQUEL; AS – ARSÊNIO; CD – CÁDMIO; PB – CHUMBO; SN - ESTANHO; AL – ALUMÍNIO.	33
TABELA 3.4 - VALORES MÉDIOS \pm DP OBTIDOS NA ANÁLISE DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS DA BIOMASSA CONCENTRADA RECOLHIDA DAS CULTURAS DE MICROALGAS ANTES DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO; OS RESULTADOS APRESENTAM-SE EM PERCENTAGEM (%).	34
TABELA 3.5 - VALORES MÉDIOS \pm DP OBTIDOS NA ANÁLISE DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS DA BIOMASSA CONCENTRADA E RECOLHIDA DAS CULTURAS DE MICROALGAS APÓS O PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO; OS RESULTADOS APRESENTAM-SE EM PERCENTAGEM (%).	35
TABELA 3.6 - VALORES MÉDIOS \pm DP OBTIDOS NA ANÁLISE DO TEOR EM AÇÚCARES, PROTEÍNAS E LÍPIDOS TOTAIS, DA BIOMASSA LIOFILIZADA DAS DUAS ESPÉCIES DE MICROALGAS EM ESTUDO; OS RESULTADOS APRESENTAM-SE EM PERCENTAGEM (%).	35
TABELA 3.7 - VALORES MÉDIOS \pm DP OBTIDOS NA ANÁLISE COLORIMÉTRICA ÀS PRIMEIRAS FORMULAÇÕES DE GELADO; N1 – GELADO DE NATA CONTROLO; C1 - GELADO DE NATA CONTENDO 5 mL DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; P1 - GELADO DE NATA CONTENDO 10 mL DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> ; N2 – GELADO DE NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; C2 - GELADO DE NATA CONTENDO 10 mL DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> E MENOS 20% DE AÇÚCAR; P1 - GELADO DE NATA CONTENDO 20 mL DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> E MENOS 20% DE AÇÚCAR; L* - LUMINOSIDADE (PRETO-BRANCO); A* - VERDE-VERMELHO; B* - AZUL-AMARELO; C* - SATURAÇÃO; H° - TONALIDADE; AS LETRAS DIFERENTES (A – F) EM CADA COLUMNA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO PARÂMETRO NAS VÁRIAS FORMULAÇÕES DE GELADO.	37
TABELA 3.8 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS MINERAIS, PELO MÉTODO XRF, DAS FORMULAÇÕES DE GELADO PRODUZIDAS (N1– GELADO NATA CONTROLO; C1 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 5 mL DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; P1 - GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 10 mL DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> ; OS ELEMENTOS MINERAIS ENCONTRAM-SE EM MG/100G DE MASSA HÚMIDA. CA – CÁLCIO; K – POTÁSSIO; P – FÓSFORO; CL – CLORO; S – ENXOFRE; MG – MAGNÉSIO; SI – SILÍCIO; FE – FERRO; SE – SELÊNIO; ZN – ZINCO; CU – COBRE; CR – CRÓMIO; NI – NÍQUEL; AS – ARSÊNIO; CD – CÁDMIO; PB – CHUMBO; SN - ESTANHO; AL – ALUMÍNIO. AS LETRAS DIFERENTES (A –B) EM CADA COLUMNA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO ELEMENTO MINERAL NAS VÁRIAS FORMULAÇÕES DE GELADO.	39

TABELA 3.9 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS MINERAIS, PELO MÉTODO XRF, DAS FORMULAÇÕES DE GELADO PRODUZIDAS (N2 – GELADO NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; C2 – GELADO DE NATA COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR E INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; P2 - GELADO DE NATA COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR E INCORPORAÇÃO DE 20 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i>); OS ELEMENTOS MINERAS ENCONTRAM-SE EM MG/100G DE MASSA HÚMIDA. CA – CÁLCIO; K – POTÁSSIO; P – FÓSFORO; CL – CLORO; S – ENXOFRE; MG – MAGNÉSIO; SI – SILÍCIO; FE – FERRO; SE – SELÊNIO; ZN – ZINCO; CU – COBRE; CR – CRÓMIO; NI – NÍQUEL; AS – ARSÊNIO; CD – CÁDMIO; PB – CHUMBO; SN - ESTANHO; AL – ALUMÍNIO. AS LETRAS DIFERENTES (A – C) EM CADA COLUNA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO ELEMENTO MINERAL NAS VÁRIAS FORMULAÇÕES DE GELADO.	40
TABELA 3.10 - VALORES DE REFERÊNCIA DO NUTRIENTE, EM PORCENTAGEM, PARA OS MINERAIS CÁLCIO, POTÁSSIO, FÓSFORO E CLORO, PRESENTES EM 100 G DE GELADO DAS FORMULAÇÕES CONCEBIDAS (N1,2 – GELADO NATA CONTROLO; C1,2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; C1 – 5 ML DE BIOMASSA/C2 – 10 ML DE BIOMASSA; P1,2 - GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> ; P1 – 10 ML DE BIOMASSA/P2 – 20 ML DE BIOMASSA).	41
TABELA 3.11 - VALORES MÉDIOS \pm DP OBTIDOS DAS ANÁLISES AOS MACROCONSTITUINTES DAS VÁRIAS FORMULAÇÕES DE GELADO (N1,2 – GELADO NATA CONTROLO; N2 – GELADO DE NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR C1,2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; C1 – 5 ML DE BIOMASSA/C2 – 10 ML DE BIOMASSA E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; P1,2 - GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> ; P1 – 10 ML DE BIOMASSA/P2 – 20 ML DE BIOMASSA E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR); OS RESULTADOS ENCONTRAM-SE EM G/100 ML E VRN EM PORCENTAGEM (%). AS LETRAS DIFERENTES (A – B) EM CADA COLUNA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO MACRONUTRIENTE NA FORMULAÇÃO DE GELADOS 1, (R-S) PARA O MESMO EFEITO NA FORMULAÇÃO DE GELADOS 2.	42
TABELA 3.12 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS RESULTADOS DA ANÁLISE SENSORIAL HEDÔNICA ÀS PRIMEIRAS FORMULAÇÕES DE GELADO CONCEBIDAS (N1 – GELADO DE NATA CONTROLO; C1 – GELADO DE NADA COM INCORPORAÇÃO DE 5 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; P1 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i>); AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS DOS GELADOS CONFECIONADOS; AS LETRAS DIFERENTES (A – B) EM CADA COLUNA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO ATRIBUTO AVALIADO NA ANÁLISE SENSORIAL DA FORMULAÇÃO DE GELADOS.....	45
TABELA 3.13 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS RESULTADOS DA INTENÇÃO DE COMPRA DAS PRIMEIRAS FORMULAÇÕES DE GELADO CONCEBIDAS (N1 – GELADO DE NATA CONTROLO; C1 – GELADO DE NADA COM INCORPORAÇÃO DE 5 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> ; P1 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i>); AS LETRAS DIFERENTES (A – B) EM CADA COLUNA REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISADA A INTENÇÃO DE COMPRA DA FORMULAÇÃO DE GELADOS	47
TABELA 3.14 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS RESULTADOS DA ANÁLISE SENSORIAL HEDÔNICA ÀS SEGUNDAS FORMULAÇÕES DE GELADO CONCEBIDAS (N2 – GELADO DE NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; C2 – GELADO DE NADA COM INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; P2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 20 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR); AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS DOS GELADOS CONFECIONADOS; AS LETRAS DIFERENTES (A – B) EM CADA COLUNA REPRESENTAM DIFERENÇAS	

SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0.05$), PELO TESTE DE TUKEY, QUANDO ANALISANDO DETERMINADO ATRIBUTO AVALIADO NA ANÁLISE SENSORIAL DA FORMULAÇÃO DE GELADOS.....	47
TABELA 3.15 - VALORES MÉDIOS \pm DP DOS RESULTADOS DA INTENÇÃO DE COMPRA DAS SEGUNDAS FORMULAÇÕES DE GELADO CONCEBIDAS (N2 – GELADO DE NATA CONTROLO COM REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; C2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 10 ML DE BIOMASSA DE <i>C. VULGARIS</i> E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR; P2 – GELADO DE NATA COM INCORPORAÇÃO DE 20 ML DE BIOMASSA DE <i>P. PURPUREUM</i> E REDUÇÃO DE 20% DE AÇÚCAR).	48
TABELA 7.1 - TABELA DESCRITIVA DE TODOS OS REAGENTES UTILIZADOS AO LONGO DO TRABALHO, RESPETIVA PUREZA E MARCA.	63
TABELA 7.2 - TABELA DESCRITIVA DE TODOS OS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS AO LONGO DO TRABALHO, RESPETIVO MODELO E MARCA.	65
TABELA 7.3 - REAGENTES E RESPETIVA CONCENTRAÇÃO PARA ELABORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	67
TABELA 7.4 - REAGENTES E RESPETIVA CONCENTRAÇÃO PARA ELABORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE <i>PORPHYRIDIVM PURPUREUM</i>	67

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

- Al – alumínio.
- ANOVA – análise de variância.
- As – arsénio.
- C1 – gelado de nata + 5 mL de concentrado de biomassa de *Chlorella vulgaris*.
- C2 – gelado de nata com redução de 20% do açúcar + 10 mL de concentrado de biomassa de *Chlorella vulgaris*.
- Ca – cálcio.
- Cd – cádmio.
- Cl – cloro.
- CO₂ – dióxido de carbono.
- Cr – crómio.
- Cu – cobre.
- DL50 – dose letal média.
- DP – desvio padrão.
- EU – União Europeia.
- Fe – ferro.
- K – potássio.
- Mg – magnésio.
- N1 – gelado de nata controlo.
- N2 – gelado de nata controlo com redução de 20% do açúcar.
- NaOH – hidróxido de sódio.
- Ni – níquel.
- P1 – gelado de nata + 10 mL de concentrado de biomassa de *Porphyridium purpureum*.
- P2 – gelado de nata com redução de 20% do açúcar + 20 mL de concentrado de biomassa de *Porphyridium purpureum*.
- P – fósforo.
- Pb – chumbo.
- PUFA – ácidos gordos polinsaturados.
- S – enxofre.
- Se – selénio.
- Si – silício.
- Sn – estanho.
- VRN – valor de referência do nutriente.
- Zn – zinco.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um gelado com características funcionais à base de microalgas. Para atingir este objetivo, foram propostos outros, mais específicos, como: estudar, na prática, a tecnologia de produção de microalgas em ambiente controlado, desenvolvendo culturas de microalgas *Chlorella vulgaris* (Kessler & Huss, 1992) e *Porphyridium purpureum* ((Bory) K. M. Drew & R. Ross, 1965); otimizar a formulação de um gelado contendo microalgas, em função das características organoléticas e funcionais do produto acabado; avaliar o perfil nutricional das formulações desenvolvidas, e elaborar o perfil sensorial das diferentes formulações conseguidas.

Ao longo do período experimental, foi possível aprofundar conhecimentos laboratoriais, nomeadamente técnicas utilizadas para determinação do teor de macro e micronutrientes, bem como aperfeiçoar conhecimentos de análise estatística.

O presente trabalho inicia com uma introdução teórica sobre as várias matérias de interesse para o desenvolvimento do produto alimentar final, passando, de seguida, para a descrição da metodologia utilizada ao longo dos vários processos. Após a descrição surge a apresentação de resultados e sua discussão, seguida pela conclusão do trabalho. São, ainda, apresentadas algumas perspetivas futuras, nomeadamente possíveis desenvolvimentos do projeto, e, no final do trabalho, após enumeração das referências bibliográficas utilizadas, um capítulo de anexos que complementam todo o trabalho.

1.1. ALIMENTAÇÃO FUNCIONAL

Num mundo em que o estilo de vida da grande maioria das populações é cada vez mais acelerado e ocupado, em que a esperança média de vida tem vindo a aumentar, levando a um envelhecimento da população, e em que os cuidados médicos são cada vez mais dispendiosos (Granato *et al.*, 2010; Sanders, 1998) as tendências alimentares dos consumidores começaram a mudar (Mark-Herbert, 2004), e surgiu a necessidade de investir na criação de produtos alimentares que satisfizessem outras necessidades, para além da nutrição básica e saciação da fome.

Os consumidores modernos que têm, cada vez mais, acesso a informação oferecida pelas autoridades de saúde e pelos *media* no que toca à nutrição e à ligação entre a alimentação e a saúde, têm consciência dos efeitos do seu estilo de vida na sua saúde, nomeadamente fraca alimentação e ausência de exercício físico, e também, pela automedicação (Siró *et al.*, 2008; Corbo *et al.*, 2014; Shah e Prajapati, 2014). Assim, estes desejam que os alimentos que ingerem sejam saudáveis e capazes de prevenir doenças (Granato *et al.*, 2010; Sanders, 1998; Sloan, 2008). Neste sentido, a crescente tendência para uma alimentação saudável levou os consumidores a exercer uma forte pressão sobre a indústria alimentar, para que formulasse produtos mais nutritivos, com comprovados efeitos benéficos para a sua saúde, uma vez que os produtos presentes no mercado (elevado teor de fibra, baixos níveis de gordura e açúcar, etc.) já não eram suficientes (Pszczola, 2008).

Deste modo, respondendo à pressão e às necessidades dos consumidores, a indústria alimentar investiu na investigação e na inovação do setor, aliada à evolução na área bioquímica e biotecnológica, que tornou possível isolar uma grande variedade de ingredientes agroalimentares com comprova-

das propriedades bioativas benéficas para a saúde do Homem (Wildman, 2002). Este aumento de conhecimento acerca do impacto da dieta na saúde humana, e as descobertas significativas no campo da nutrição, levaram ao reconhecimento do papel dos alimentos como agentes de promoção e melhoramento da saúde, iniciando o desenvolvimento e produção em massa de novas classes de alimentos, os chamados “alimentos funcionais” (Biesalski *et al.*, 2009; Honkanen, 2009).

O conceito de alimento funcional surgiu no Japão, na década de 80, fruto de um programa do governo que tinha em vista a regulamentação do uso de produtos alimentares alegadamente promotores de saúde e, também, o desenvolvimento de alimentos saudáveis para uma população envelhecida, mas com uma elevada esperança média de vida (Anjo, 2004; Martins *et al.*, 2004).

Tendo em conta a globalização dos produtos alimentares funcionais, tornou-se necessário definir o seu conceito, para se tornarem devidamente regulamentados. Segundo uma publicação por parte da Comissão Europeia (European Commission, 2010), relativa aos chamados “alimentos funcionais”, não existe uma definição oficial, ou globalmente aceite, apenas diversas definições, as quais culminam no conceito de que um alimento funcional contém um ou mais ingredientes funcionais que providenciam benefícios para a saúde, além do valor nutricional e energético base, promovendo a saúde e contribuindo para a diminuição do risco de doença, quando consumidos como parte de uma dieta regular (Lordan *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2002; Roberfroid, 2002). Na mesma publicação (European Commission, 2010) está exposta uma definição, proposta pela Comissão Europeia de Ação Coordenada na Ciência de Alimentação Funcional na Europa (FUFLOSE), determinando que um alimento funcional é um alimento que afeta benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo, além dos efeitos nutricionais adequados, de uma maneira relevante para melhorar o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de doença; é consumido como parte de uma dieta normal e não é um comprimido, cápsula ou qualquer outra forma de suplemento dietético. Esta definição procura consciencializar os consumidores que, muitas vezes, são atraídos pelo *marketing* no qual determinado produto está envolto, sendo atraídos pelas alegações de saúde exageradas na publicidade, uma vez que alguns ainda acreditam que, qualquer alimento, se propriamente publicitado, particularmente se acompanhado com uma alegação de saúde, é um alimento funcional (European Commission, 2010).

Assim, de forma a ir de encontro à crescente consciencialização acerca da relação dieta-doenças, é de extrema importância, para produtores e comerciantes de alimentos funcionais, e também para o consumidor, identificar os constituintes alimentares específicos que podem promover a saúde e bem-estar, diminuir o risco de doença, bem como as condições exatas em que demonstram esse efeito benéfico (Anjo, 2004; European Commission, 2010). Alguns exemplos de alimentos funcionais que vão de encontro à definição proposta pela FUFLOSE, e que possuem efeito benéfico comprovado cientificamente, são: alimentos naturais que podem ou não ter sido modificados por seleção ou outras tecnologias (ex: tomates enriquecidos em licopeno, arroz enriquecido em vitamina A); alimentos aos quais foram adicionados componentes bioativos (ex: adição de fitoesteróis); alimentos nos quais um ou vários componentes foram modificados, substituídos, ou aperfeiçoados, para melhorar as propriedades benéficas (ex: iogurtes com pré-bióticos ou probióticos, sumos com elevado poder antioxidante) (European Commission, 2010; Shah e Prajapati, 2014).

Desde que surgiu o conceito de alimento funcional, e até aos dias de hoje, o mercado desta classe de alimentos tem vindo a crescer globalmente, representando uma das áreas mais promissoras da investigação e inovação no setor alimentar, como sugere o grande aumento do número de literatura científica disponível sobre este tema (Patel, 2017), sendo incentivado pelos desenvolvimentos científicos a nível nutricional, bem como pela competitividade do mercado. Estes fatores permitem que o mercado destes produtos funcionais seja dinâmico e com boas perspetivas de crescimento para as indústrias que aceitaram e aderiram a este conceito (Siró *et al.*, 2008). Segundo dados da *Euromonitor International* (Euromonitor, 2009), o valor de vendas destes produtos aumentou, globalmente, cerca de 60% entre 1998 e 2003, e 40% em 2008. Já na Europa, estima-se que este mercado gerou entre 4 e 8 mil milhões US\$ em 2003, valor que aumentou para 15 mil milhões em 2006 (Kotilainen *et al.*, 2006). Em 2006, o mercado dos produtos alimentares funcionais correspondia a cerca de 1% do mercado alimentar global, tendo a Alemanha, Holanda, França e Reino Unido como principais intervenientes (Makinen-Aakula, 2006). No mesmo ano, em Espanha, este mesmo mercado correspondia a cerca de 17% do mercado alimentar nacional, prevendo-se ultrapassar os 40% em 2020 (Monar, 2007).

O crescente mercado de alimentos funcionais, bem como o aumento do número de consumidores destes produtos e a sua exigência, requerem inovação firme e, por isso, o mercado está constantemente a requisitar novas formulações com evidência científica de benefícios para a saúde, e novos compostos bioativos que possam ser utilizados no desenvolvimento de novos produtos (Herrero *et al.*, 2015). Esta procura conduziu à investigação dos efeitos fisiológicos de componentes biológicos de elevado valor nutricional (Batista *et al.*, 2013), e também à busca por organismos produtores naturais de compostos nutricionalmente relevantes (Assunção *et al.*, 2017), levando a um rápido progresso nas metodologias analíticas de extração e caracterização de produtos biológicos (Jaime *et al.*, 2005).

Segundo a literatura científica da área, um dos mais promissores organismos produtores de compostos bioativos são as microalgas (Batista *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2013; Fradique *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2010; Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013). Por volta de 1900, o conteúdo proteico de algumas espécies despertou interesse nos cientistas alemães como uma potencial fonte alimentar, mas hoje em dia é o Japão que lidera o seu consumo, utilizando-as também na medicina alternativa (Morris *et al.*, 2009). Na Europa, este mercado surgiu na década de 90 (Dawczynski *et al.*, 2007), abrindo portas ao desenvolvimento de novas formulações de produtos alimentares funcionais.

1.2. MICROALGAS

As microalgas são microrganismos unicelulares ou pluricelulares, procarióticos ou eucarióticos, fotossintéticos (Pignolet *et al.*, 2013) que se encontram em habitats complexos, de água doce ou salgada, bentónicos, litorais e oceânicos, e que suportam condições ambientais extremas, tendo a capacidade de se adaptarem a mudanças das condições do meio, como alterações de temperatura, nutrientes ou salinidade (El Gamal, 2010; Lee, 2008; Rodríguez-Meizos *et al.*, 2010). Estes seres possuem uma organização muito simples, apesar de complexa para a sua pequena dimensão (Rasmussen e Morrissey, 2007). São, também, um dos mais primitivos, tendo sido encontrado, na Austrália, um fós-

sil de uma cianobactéria que data 3.4 mil milhões de anos (Rasmussen & Morrissey, 2007; Safi *et al.*, 2014). Existe uma diversidade muito elevada de microalgas, estando reportada a existência de mais de 50 000 espécies (Hu *et al.*, 2008), com cerca de 40 000 já descritas ou analisadas, sendo que apenas algumas estão devidamente caracterizadas (Bhakuni e Rawat, 2006).

A cultura de microalgas tem crescido ao longo dos anos, em particular no setor dos biocombustíveis. Recentemente, devido à sua riqueza nutricional, começou a direccionar-se para a indústria alimentar (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013), sendo consideradas uma das mais promissoras fontes de compostos bioativos naturais que podem ser utilizados para enriquecer o perfil dos alimentos, tornando-os funcionais (Batista *et al.*, 2011; Fradique *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2010). Esta cultura possui inúmeras vantagens, entre as quais o facto de ser rentável e ambientalmente sustentável (Xia *et al.*, 2013), dado que as microalgas, durante o seu processo de fotossíntese para produção de biomassa, fixam CO₂ e produzem quantidades massivas de O₂, podendo contribuir para a redução do efeito de estufa e aquecimento global (Costa e de Moraes, 2011; Ghirardi *et al.*, 2000). Salienta-se, ainda, a elevada taxa de crescimento, visto que são capazes de duplicar a sua biomassa em cerca de 2 a 5 dias (Costa e de Moraes, 2011), a utilização eficiente de luz solar e artificial (Batista *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2010), o facto de não competirem com matéria-prima agrícola, uma vez que a sua cultura não é feita no solo e podem crescer em áreas e climas que não são indicados para agricultura (Costa e de Moraes, 2011; Singh *et al.*, 2011), podendo crescer em águas residuais e desperdícios industriais (Batista *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014; Wijffels *et al.*, 2010). Outro fator de elevada importância para a rentabilidade destas culturas é a facilidade com que crescem em ambiente controlado, produzindo elevadas quantidades de biomassa, como um bioreator, no qual é possível estimular ou inibir a biossíntese de determinado composto desejado ou indesejado, manipulando as condições do meio como temperatura, concentração de nutrientes, pH, luminosidade, salinidade, entre outros (Batista *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2013). Esta manipulação determina a composição bioquímica das microalgas, uma vez que esta depende dos macronutrientes e micronutrientes presentes no meio de cultura, bem como da indução de *stress*, ou não, visto que esta resulta na produção de metabolitos secundários ativos, de elevado interesse, para combater a oxidação celular (Chen *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2013; Karemore *et al.*, 2013).

Realçando a sua composição bioquímica, as microalgas são conhecidas pela sua riqueza em lípidos, ácidos gordos polinsaturados, a sua capacidade única de produzir triacilgliceróis naturais, proteínas, hidratos de carbono (Batista *et al.*, 2013; Draaisma *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 2010; Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013), pigmentos, antioxidantes (Amaro *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2012), vitaminas e minerais (Batista *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2010). Esta composição bioquímica é abundante em compostos de elevado valor e interesse, como compostos bioativos, que são substâncias ativas fisiologicamente, contribuindo de forma benéfica, e comprovada cientificamente, para o funcionamento do organismo, como carotenoides, compostos fenólicos, ácidos gordos, entre outros (Plaza *et al.*, 2010). Assim, tendo em conta as suas características bioquímicas e a facilidade de produção, as microalgas possuem, hoje em dia, inúmeras aplicações comerciais, sem contar com a produção de biocombustíveis, como a sua utilização como suplementos alimentares e dietéticos, incorporação em produtos alimentares como aditivos alimentares naturais (corantes) ou

para enriquecimento nutricional, cosmética, bem como em ração animal e aquacultura (Batista *et al.*, 2011; Fradique *et al.*, 2010; Safi *et al.*, 2014; Vaz *et al.*, 2016).

Como indicado anteriormente, o interesse pelas microalgas surgiu na Alemanha em 1900, mas a sua produção como suplemento alimentar, nomeadamente da espécie *Chlorella vulgaris*, iniciou-se no Japão na década de 60, sendo, atualmente, produzida e comercializada mundialmente, estimando-se uma produção total perto das 2000 toneladas, no ano de 2009, tendo como principais produtores a Alemanha, o Japão e Taiwan (Brennan e Owende, 2010). Apesar de em alguns países, como Alemanha, França, Estados Unidos da América, China e Tailândia terem vindo a aumentar o seu interesse pela alimentação funcional e iniciado a introdução de microalgas nas suas formulações alimentares, o país com mais influência na sua utilização continua a ser o Japão, investindo fortemente na investigação e desenvolvimento de novos produtos alimentares à base de microalgas (Arad E Yaron, 1992; Pulz e Gross, 2004).

Apesar de todos os benefícios, cientificamente comprovados, que as microalgas podem oferecer ao organismo humano, a investigação biotecnológica destes microrganismos, para propósitos nutricionais e de incorporação em alimentos para consumo humano, continua restrita a poucas espécies, devido às regulamentações de segurança alimentar, mas também devido a fatores comerciais e processos específicos (Batista *et al.*, 2012; Pulz e Gross, 2004).

1.2.1. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma microalga verde eucariótica e unicelular, possuidora de parede celular e pertencente ao filo Chlorophyta (**Figura 1.1**). É uma espécie conhecida pelo seu excelente conteúdo proteico, mineral, e em ácidos gordos polinsaturados (Batista *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 1996; Gouveia e Empis, 2003; Lee, 2008). Segundo a literatura, a composição bioquímica desta microalga ronda 38-40% de proteína, 5-40% de lípidos, 20% de hidratos de carbono, 24.2% de minerais, e cerca de 1.2% de pigmentos, como clorofilas a e b, carotenoides, luteína e zeaxantina (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; de Moraes *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003). Possui, também, cerca de 31% de ácidos gordos saturados, maioritariamente ácido palmítico, 21% de ácidos gordos monoinsaturados, maioritariamente ácido oleico, e 35% de ácidos gordos polinsaturados, maioritariamente ácidos $\omega 3$ (Batista *et al.*, 2013; de Moraes *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2016). Quando em condições de *stress*, *C. vulgaris* acumula elevadas concentrações de carotenoides, antioxidantes, com o objetivo de evitar a oxidação celular, o que resulta numa mudança de cor e na demonstração que a composição bioquímica não é estática, dependendo das condições do meio de cultivo, bem como de todos os fatores ambientais (de Moraes *et al.*, 2015; Gouveia *et al.*, 1996; Gouveia e Empis, 2003). Apesar da grande quantidade e variedade de compostos bioativos produzidos por esta microalga, o composto que parece ter maior importância é o β -1,3-glucano, que possui vários benefícios para a saúde, uma vez que atua como imuno-estimulador ativo, sequestra radicais livres no organismo, reduz os níveis de colesterol no sangue, e já foi demonstrada a sua ação preventiva contra aterosclerose e hipercolesterolemia (de Moraes *et al.*, 2015; Spolaore *et al.*, 2006). *Chlorella vulgaris* é das poucas espécies de microalgas autorizadas para comercialização e consumo, humano e animal,

dado que a sua segurança alimentar, toxicologia e relevância clínica estão devidamente avaliadas, não sendo conhecida produção de metabolitos tóxicos. É utilizada como alimento funcional, ingrediente em formulações de alimentos funcionais, ou como nutracêutico, visto que existe evidência dos seus benefícios no tratamento e diminuição do risco de doenças como anemia, hipertensão, diabetes, entre outros (Costa *et al.*, 2006; de Mello-Sampayo *et al.*, 2013; Vílchez *et al.*, 2011). A biomassa desta microalga tem vindo a ser utilizada com sucesso em vários produtos alimentares desenvolvidos por grupos de investigação, maioritariamente como corante alimentar e fonte de PUFA $\omega 3$, como emulsões, massas, pudins, biscoitos, pão, *snacks*, gomas, rebuçados, iogurtes, bebidas, entre outros (Batista *et al.*, 2008; Becker, 2004; Fradique *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 2007; Raymundo *et al.*, 2005).

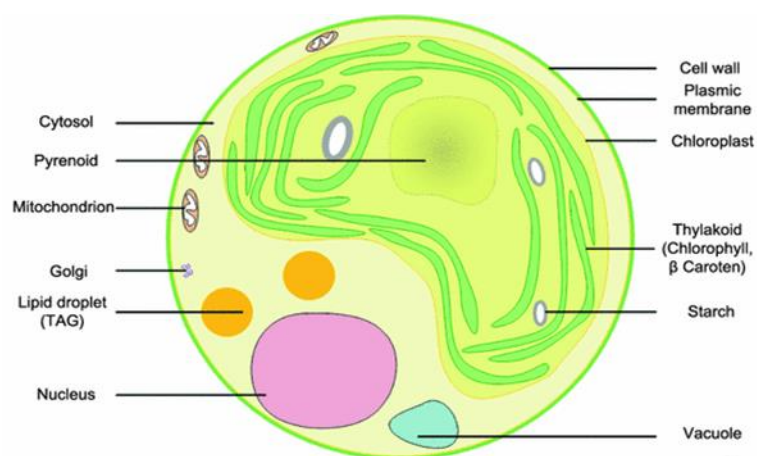


Figura 1.1 - Ilustração de uma célula Chlorophyta. Adaptado (Lee, 2008).

1.2.2. *Porphyridium purpureum*

Porphyridium purpureum é uma microalga vermelha, também eucariótica e unicelular, do filo Rhodophyta (**Figura 1.2**), rica em antioxidantes, polissacáridos, ficobiliproteínas e ácidos gordos polinsaturados (Geresh *et al.*, 2002). De acordo com a evidência existente, a sua composição bioquímica ronda 15-36% proteína, 13-30% hidratos de carbono, 18-20% minerais, 2-8% lípidos, 0.94-18.5% fibra, e 8.5% pigmentos, como ficobiliproteínas, clorofilas e carotenoides (Bernaerts *et al.*, 2018; Fuentes *et al.*, 2000; Kavitha *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2016). Possui, ainda, cerca de 10-90% ácidos gordos saturados, 6-39% ácido gordos monoinsaturados, e 5-60% ácidos gordos polinsaturados (Feller *et al.*, 2014; Kavitha *et al.*, 2016; Klein *et al.*, 2012). Apesar da sua riqueza mineral e em ácidos gordos essenciais, um dos compostos bioativos mais importantes de *P. purpureum* é a ficoeritrina, um pigmento fluorescente fotossintético, pertencente às ficobiliproteínas (Román *et al.*, 2002) atualmente utilizado como corante alimentar natural e em cosméticos (Sekar e Chandramohan, 2008). Estes compostos têm mostrado várias ações benéficas para o organismo humano, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, entre outras (Sekar e Chandramohan, 2008; Tannin-Spitz *et al.*, 2005).

Apesar de vários estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, terem demonstrado o potencial nutricional desta espécie (Ginzberg *et al.*, 2000), não foram realizados ensaios de alimentação a longo prazo suficientes para determinar possíveis efeitos secundários. Seguindo esta ideia, Kavitha *et al.* (2016) desenvolveram um estudo com o objetivo de estudar o efeito a longo prazo de alimentação à base de biomassa de *P. purpureum*, no qual utilizaram um modelo animal experimental, e avaliaram vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Os resultados do estudo de ecotoxicidade, com a duração de 14 dias, não revelaram mortalidade, e parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos não demonstraram diferenças significativas entre os animais controlo e os animais em estudo. A ingestão de doses elevadas de biomassa (5g/Kg de peso corporal) não levou a sintomas clínicos de toxicidade, podendo considerar-se a DL50 superior a 5g/Kg, o que indica que a biomassa da microalga *P. purpureum* não é tóxica, de acordo com os critérios para classificação de toxicidade aguda. Foi, ainda, realizado um estudo subcrónico, iniciando a concentração de biomassa ingerida em 2.5%, aumentando até 5%, ao longo de 13 semanas, novamente não mostrando sinais de toxicidade, reações alérgicas ou mortalidade. Ao longo do período de estudo, foi possível observar um decréscimo nos níveis de colesterol e triglicéridos, indo de encontro a estudos que mostram que as algas possuem compostos benéficos com potencial para diminuir o colesterol e lípidos, reforçando os benefícios de incorporar algas e produtos à base destas na dieta humana. O estudo de Kavitha *et al.* (2016) evidencia que a microalga em questão não produz toxinas, podendo ser incorporada em ração animal mas, no que toca ao consumo humano, são necessários ensaios clínicos a longo prazo.

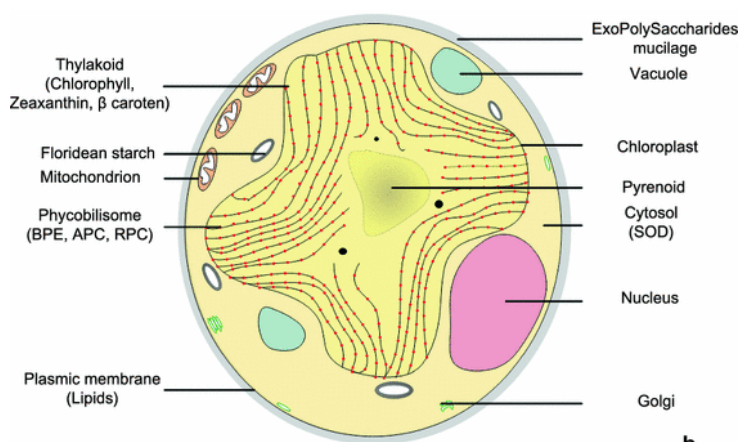


Figura 1.2 - Ilustração de uma célula Rhodophyta. Adaptado (Lee, 2008).

1.3. GELADO

Os gelados são produtos alimentares muito consumidos no verão, devido às elevadas temperaturas que se fazem sentir habitualmente (ASAE, 2009), mas cada vez mais se nota um consumo regular ao longo do ano. Em Portugal, no passado ano 2017, segundo dados do Grupo Marktest, “2 em cada três portugueses referiram ter consumido gelados de sobremesa/colher nos últimos 12 meses”, o que representa 66.4% dos residentes em Portugal continental com idade superior a 15 anos (Marktest, 2017). Este aumento de consumo visível deve-se aos atributos característicos dos gelados,

que os tornam muito atrativos, tais como a sua textura leve e cremosa, e sabores doces e frescos. Aliado às suas características apelativas, os gelados são considerados “produtos divertidos” e de “compra impulsiva”, uma vez que os consumidores são atraídos pela experiência sensorial (Babu e Shams, 2013).

Segundo a Norma Portuguesa 3293 (2008), um gelado é um “género alimentício obtido por congelação, e mantido nesse estado até ao momento de ser ingerido pelo consumidor, em cuja composição podem entrar todos os ingredientes alimentares, bem como os aditivos previstos pela legislação em vigor”. Assim, um gelado alimentar caracteriza-se por ser uma mistura homogênea de matérias gordas e substâncias proteicas, com ou sem adição de outros ingredientes alimentares (Lidon e Silvestre, 2007). Para este género alimentício, consideram-se ingredientes principais: leite (em natureza, pasteurizado, concentrado, desidratado, fermentado, constituintes do leite e outros produtos lácteos), gorduras (de origem animal e vegetal e/ou uma mistura de ambas em proporções não definidas), proteínas (lácteas contendo uma ou mais proteínas do leite e proteínas não lácteas, quer uma mistura em proporções não definidas), açúcares (como sacarose, xarope de glucose, dextrose e frutose), e água (Instituto Português da Qualidade, 2008). A estes ingredientes podem ser adicionados outros, como aromas, fruta fresca, cacau, entre outros, de forma a tornar o produto mais apelativo para o consumidor. Estes produtos requerem cuidados redobrados, no que toca à temperatura, uma vez que esta é um grande fator de deterioração da qualidade dos seus atributos, devendo ser mantidos a uma temperatura igual ou inferior a -17°C, podendo colocar-se uma película aderente à superfície para minorar a perda de qualidade durante o armazenamento (ASAE, 2009). Relativamente à sua classificação, os gelados são classificados consoante a sua composição, podendo dividir-se em *ice cream*, *water ice*, e *sorbet*, sendo *ice cream* a categoria que integra os gelados de nata e de leite (podendo estes conter gordura vegetal, aromas, frutas, entre outros ingredientes adicionados), *water ice* que se refere a gelados compostos por xarope de açúcar, corantes e aromas, e *sorbet* que é composta por gelados à base de produtos cítricos e outros frutos, não contendo produtos lácteos (Lidon e Silvestre, 2007). Especificando melhor a classificação de “gelado de nata”, uma vez que é relevante para o contexto do presente trabalho, a Norma Portuguesa 3293 (2008) refere que é um produto que contempla “pelo menos 5% de gordura láctea com exclusão das gorduras e, ou, proteínas que não sejam lácteas”.

Tal como qualquer outra indústria, ou ramo da indústria alimentar, a produção de gelados alimentares foi forçada a evoluir e inovar, não só para corresponder aos desejos dos consumidores, mas também para captar novos clientes. Como referido anteriormente, as tendências alimentares dos consumidores têm vindo a alterar-se, procurando uma alimentação mais saudável e funcional (Babu e Shams, 2013; Granato *et al.*, 2010; Mark-Herbert, 2004), o que levou a que surgissem novas formulações, em particular de baixo teor calórico, de todo o tipo de produtos, e os gelados não foram exceção. Nos últimos anos têm surgido inovadoras formulações de gelados para indivíduos com alergias e intolerâncias alimentares (Buyck *et al.*, 2011), bem como de gelados funcionais com adição de antioxidantes e bactérias probióticas (Soukulis *et al.*, 2010). Apesar do desejo de inovação, os consumidores continuam a procurar uma experiência sensorial de elevada qualidade, pelo que as empresas devem continuar a focar-se nos atributos como cremosidade, sabor e *flavour* (Babu e Shams, 2013).

2. METODOLOGIA

Neste capítulo estão descritas as metodologias utilizadas ao longo do trabalho experimental. Todos os reagentes e equipamentos utilizados na execução deste trabalho encontram-se discriminados nas **Tabelas 6.1 e 6.2** em **Anexo 1**.

2.1. MICROALGAS

2.1.1. MATÉRIA-PRIMA

As microalgas utilizadas neste estudo, *Chlorella vulgaris* e *Porphyridium purpureum*, foram adquiridas através do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), mais propriamente da Unidade de Bioenergia, assim como as formulações dos meios de cultura de cada espécie de microalga. Estas formulações foram adaptadas às condições do laboratório

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho foi estudar, na prática, a tecnologia de produção de microalgas em ambiente controlado, o crescimento, bem como a pureza das culturas, foi monitorizado ao longo do tempo através de técnicas como colorimetria, espectrofotometria, e microscopia.

Ambas as espécies utilizadas foram cultivadas em regime fototrófico e colhidas em fase de crescimento. O processo de cultura das microalgas realizou-se de fevereiro a junho de 2018, contemplando vários momentos de recolha de biomassa microalgal.

A cultura de microalgas, para incorporação no produto final, iniciou-se com a adição de 20 mL de cada cultura fornecida pelo LNEG (*C. vulgaris* e *P. purpureum*) a 180 mL de água destilada, perfazendo o volume de 200 mL, em balões erlenmeyer separados e com agitação constante a 320 rpm, para ativação das mesmas (**Figura 2.1-A e 2.1-B**). Além da agitação, estas culturas estiveram constantemente iluminadas por uma lâmpada fluorescente para aquário e em permanente aeração através de bombas para aquário. A temperatura do laboratório permaneceu controlada, a $20^{\circ}\text{C} \pm 3$.

Após 3 dias, foi elaborado meio de cultura para cada uma das microalgas, totalizando um volume final de 2 L para *C. vulgaris*, num balão volumétrico de 3L, e 1 L para *P. purpureum*, num balão erlenmeyer de 2L. A composição dos meios de cultura encontra-se nas **Tabelas 6.3 e 6.4** do **Anexo 2**.

Passados 15 dias, procedeu-se à mudança de meio de cultura. Para tal retiraram-se as culturas das placas de agitação e colocaram-se numa câmara escura durante 4 dias, favorecendo a sedimentação das microalgas, para remoção do meio sobrenadante.

A biomassa foi, posteriormente, centrifugada a 3000 rpm/min, durante 15 minutos, para remoção do meio de cultura restante.

De seguida foi elaborado meio de cultura para cada uma das microalgas, totalizando um volume de 5 L para *C. vulgaris*, tendo sido utilizado um garrafão de água de 6 L, previamente lavado, e 2 L para *P. purpureum*, utilizando um balão erlenmeyer de 3 L (**Figura 2.1-C**).

Cerca de 20 dias após a mudança de meio, iniciou-se a extração das microalgas para armazenamento e posterior incorporação no produto alimentar final. Para tal, procedeu-se à centrifugação da cultura a 3000 rpm/min, durante 15 minutos, para remoção do meio de cultura.

Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à lavagem do precipitado, adicionando 5 mL de água destilada, repetindo o processo duas vezes. Terminadas as lavagens, ressus-

pendeu-se o precipitado em 500 µL de água destilada, com auxílio de um vortex, e armazenou-se em tubos de plástico de 10 mL, num frigorífico a 4°C. Após sedimentação das microalgas, retirou-se o sobrenadante, correspondendo a água destilada, e concentraram-se as microalgas, adicionando precipitado de vários tubos num só, até atingir 10 mL.

Este processo foi repetido durante vários dias, tratando-se de um processo demorado, dado que a máquina centrífuga apenas suporta 8 tubos de 10 mL.

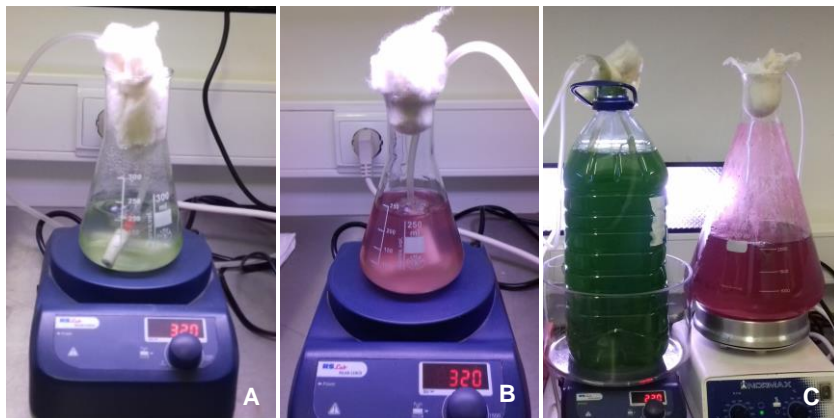


Figura 2.1 - Fotografias da montagem experimental das culturas de microalgas; A - cultura de *C. vulgaris* numa fase inicial; B - cultura de *P. purpureum* numa fase inicial; C - culturas de ambas as espécies numa fase final.

2.1.2. MONITORIZAÇÃO DAS CULTURAS

a) COLORIMETRIA

Um dos métodos utilizados para monitorização das culturas de microalgas foi a análise colorimétrica, identificando os parâmetros de cor pelo sistema CIELab, partindo do princípio que, com o aumento de biomassa, a cor da cultura altera-se, escurecendo.



Figura 2.2 - Fotografia do equipamento (colorímetro) utilizado para análise colorimétrica.

A cor é determinada pela frequência de onda que determinado objeto reflete, aplicando-se também a seres vivos e a outras matérias a analisar (Vieira, 2011).

Para análise visual da cor, utilizam-se as coordenadas cromáticas do sistema CIELab, sendo estas: L^* que diz respeito à luminosidade e varia do 0 (preto) a 100 (branco); a^* varia do verde (-), a vermelho (+); b^* estende-se do azul (-) ao amarelo (+) (Pessoa, 2018a). Estas três dimensões representam as cores visíveis ao olho humano.

Num espaço tridimensional, as dimensões separam a luz ambiente, ou a luminosidade (L^*), num eixo vertical e a cromaticidade num plano horizontal. A cromaticidade pode ainda ser representada e discutida em termos das coordenadas polares, croma (C^*), referindo-se à saturação da cor, isto é, intensidade, e ângulo de cor (h°), ou tonalidade (Pessoa, 2018a).

Como é possível observar na **Figura 2.3**, é possível fazer uma correspondência entre valores numéricos de tonalidade e cores básicas, nomeadamente $h^\circ=0^\circ$ correspondendo a vermelho, $h^\circ=90^\circ$ corresponde a amarelo, $h^\circ=180^\circ$ diz respeito à cor verde, e, por fim, $h^\circ=270^\circ$ está associado à cor azul. Na mesma figura é, também, possível observar que valores de $a^*=b^*$, assim como de C^* próximo de zero, correspondem a cores cinzentas, e valores de saturação acima de zero associam-se ao grau de pureza ou intensidade da cor, isto é, quanto mais elevado o valor C^* , mais intensa é a cor.

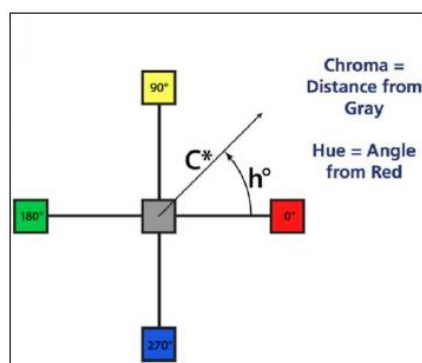


Figura 2.3 - Cor representada graficamente. Adaptado (Loskotova, n.d.).

Tendo em conta o protocolo de Pessoa (2018a), a leitura da cor realizou-se sempre em triplicado e diretamente a partir do material que continha a cultura. O equipamento foi programado para realizar três disparos em cada leitura, e os parâmetros L^* , a^* e b^* são lidos automaticamente pelo mesmo. Foram realizadas várias leituras ao longo do período de crescimento da cultura. Para tal, utilizou-se o seguinte método:

1. Calibrou-se o equipamento, fazendo uma leitura no azulejo padrão;
2. Fez-se a leitura de cada cultura de microalgas, anotando os valores correspondentes aos parâmetros L^* , a^* e b^* ;
3. Introduziram-se os valores resultantes das leituras numa folha de cálculo, fornecida pelo equipamento, para obter os valores de C^* e h° .

b) MICROSCOPIA ÓTICA

Um microscópio é um instrumento que permite produzir uma imagem ampliada de determinado objeto de estudo (Rye *et al.*, 2017).

Para avaliar a pureza, observando se, nas culturas, existiam outros microrganismos além das microalgas desejadas, e o crescimento, partindo do princípio que, com o avanço do tempo, seriam observadas cada vez mais células no campo de observação, foi utilizado um microscópio de campo claro composto, ou seja, um microscópio com múltiplas lentes que utiliza luz visível para observação (Rye *et al.*, 2017).

Foram realizadas várias observações durante o período de crescimento das culturas, seguindo o presente método:

1. Com uma pipeta *pasteur* recolheu-se uma amostra da cultura;
2. Colocou-se uma gota da amostra numa lâmina de microscopia e cobriu-se com uma lamela;
3. Colocou-se a lâmina no microscópio;
4. Observou-se a amostra.

Neste procedimento não foram feitas contagens de células por não existir um hemacitômetro no laboratório.

2.1.3. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

a) ESPETROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR

A espectrofotometria é um método de análise que utiliza um espectrofotômetro para medir quantitativamente a absorção de luz pelas soluções em estudo, baseando-se no princípio de que a concentração da solução absorvente é proporcional à quantidade de luz absorvida (Lei de Lambert-Beer) (Ninfa *et al.*, 1998).

A absorvância refere-se à medida da luz absorvida, sendo medida pela redução da intensidade da luz transmitida e, através da equação da Lei de Lambert-Beer, permite calcular a concentração de determinada amostra (Ninfa *et al.*, 1998).

As leituras das culturas de microalgas realizaram-se em comprimentos de onda na zona do visível, o que corresponde a um intervalo entre 380 e 750 nm, tentando determinar a presença de clorofilas e carotenoides nas culturas (Lichtenthaler e Buschmann, 2005). Abaixo de 380 nm corresponde a radiação ultravioleta (UV) e acima de 750 denomina-se zona infravermelha (IV).

Foram realizadas diversas leituras durante o período de crescimento das culturas de microalgas, sensivelmente 3 vezes por semana, com a finalidade de monitorizar o crescimento das culturas e adquirir conhecimento acerca dos seus pigmentos, segundo o método:

1. Com uma pipeta *pasteur* recolheu-se uma amostra da cultura;
2. Transferiu-se para uma cuvete plástica destinada ao aparelho;
3. Antes da leitura de cada uma das culturas, fez-se uma primeira leitura com meio de cultura de cada uma (branco), correspondendo ao “auto-zero”, isto é, correção de valores;

4. Fez-se a leitura das amostras num intervalo entre 380 e 750 nm, correspondendo à zona do visível.

b) ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS

O método de análise de elementos minerais utilizado foi espectrometria de fluorescência de raios-x (XRF) (**Figura 2.4**), baseado na especificidade de cada elemento químico ao ser excitado por radiação. A incidência da radiação na amostra provoca a passagem dos átomos para o estado excitado, levando os eletrões a afastarem-se do núcleo e a criarem um espaço vazio, que é preenchido por outro eletrão proveniente das camadas mais externas da nuvem eletrónica. Durante este processo, o eletrão emite determinada radiação, específica de cada elemento químico, que é detetada pelo aparelho e permite quantificar a sua proporção na amostra (Pessoa, 2018b). Este processo permite a quantificação de macroelementos, microelementos e contaminantes, presentes nas amostras analisadas. Macroelementos são sais minerais cujas necessidades no ser humano superam as 100 mg diárias, e microelementos correspondem a minerais cujas concentrações diárias requeridas para o Homem são inferiores a 100 mg (Lidon e Silvestre, 2010). Estes microelementos podem, ainda, dividir-se em elementos considerados essenciais, provavelmente essenciais, e potencialmente tóxicos, correspondendo a contaminantes e alguns metais pesados (Lidon e Silvestre, 2010).

As leituras foram realizadas em triplicado, segundo o seguinte protocolo:

1. Transferiu-se uma amostra de cada cultura de microalgas, previamente concentrada e armazenada, para cuvetes específicas para o efeito, cobrindo-as com uma película transparente adequada;
2. Colocou-se as cuvetes num analisador portátil de radiação-X;
3. Emitiu-se radiação durante 360 segundos, em atmosfera enriquecida em hélio;
4. Após as análises, transferiram-se os dados do equipamento para o computador, em formato *Excel*, para tratamento estatístico.

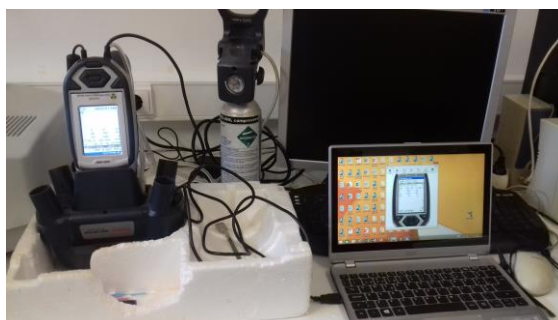


Figura 2.4 - Fotografia do aparelho portátil de radiação-x em funcionamento.

Através desta análise foi possível quantificar a presença de macroelementos, como cálcio, potássio, fósforo, magnésio, cloro e enxofre; microelementos, como silício, ferro, cobre, zinco, crómio, níquel e selénio; contaminantes, como arsénio, cádmio, chumbo, estanho e alumínio.

c) TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS DE BIOMASSA MICROALGAL HÚMIDA

Através deste procedimento, uma quantidade conhecida de amostra é sujeita a secagem em estufa, a 105°C. A biomassa seca é pesada, tornando possível calcular o teor de sólidos totais. De seguida é colocada numa mufla a 550°C, e após esse período de tempo, é possível determinar o teor de cinzas, ou seja, minerais.

O procedimento foi realizado em duplicado e foi o seguinte:

1. Tararam-se os cadinhos na mufla a 550° durante 1 hora e, após o período de tempo, colocaram-se num exsiccador;
2. Após atingirem a temperatura ambiente, pesaram-se os cadinhos;
3. Colocaram-se 2.5 mL de biomassa de *Chlorella vulgaris* e 5 mL de biomassa de *Porphyridium purpureum* nos respetivos cadinhos, pesando-os;
4. Colocaram-se os cadinhos com as amostras na estufa, a 105°C durante 24 horas, passando-os para um exsiccador terminado o período de tempo, pesando-os quando atingida a temperatura ambiente, sendo possível determinar o teor de sólidos totais;
5. De seguida colocaram-se os cadinhos na mufla, a 550°C durante 1 hora, para incineração da amostra;
6. Desligou-se a mufla, deixou-se arrefecer as amostras e de seguida tiraram-se os cadinhos para dentro de um exsiccador, pesando-os quando atingida a temperatura ambiente, permitindo determinar o teor de minerais (cinzas).

As expressões utilizadas para determinar o teor de sólidos totais (peso seco) e de minerais (cinzas) foram as seguintes:

$$\text{Peso seco (\%)} = \frac{m_4 - m_1}{m_3} \times 100$$

$$\text{Cinzas (\%)} = (m_5 - m_1) \times 100$$

Esta análise tornou, também, possível determinar o teor de humidade e o teor de sólidos totais livres de cinzas através das seguintes equações:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_2 - m_4}{m_3} \times 100$$

$$\text{Peso seco livre de cinzas (\%)} = \frac{m_4 - m_5}{m_3} \times 100$$

onde m_1 representa a massa, em gramas, dos cadinhos tarados, m_2 corresponde à massa dos cadinhos com amostra, m_3 corresponde à diferença entre estes dois valores, isto é, à massa da biomassa microalgal, m_4 refere-se à massa após o período na estufa e, por fim, m_5 corresponde à massa após o período na mufla.

d) LIOFILIZAÇÃO DA BIOMASSA

Para os restantes processos de caracterização da biomassa foi necessário submete-la a um processo de liofilização (**Figura 2.5**).

1. Centrifugou-se a biomassa microalgal durante 10 minutos, a 10 000 rpm;
2. Transferiu-se o precipitado resultante para placas de petri, que foram colocadas num congelador, a -20°C, durante 4°C;
3. Passaram-se as placas de petri para um liofilizador de bancada, ficando a liofilizar *overnight*, o que correspondeu aproximadamente a 18 horas;
4. Acondicionaram-se as amostras liofilizadas num congelador, a -20°C, até posterior utilização.

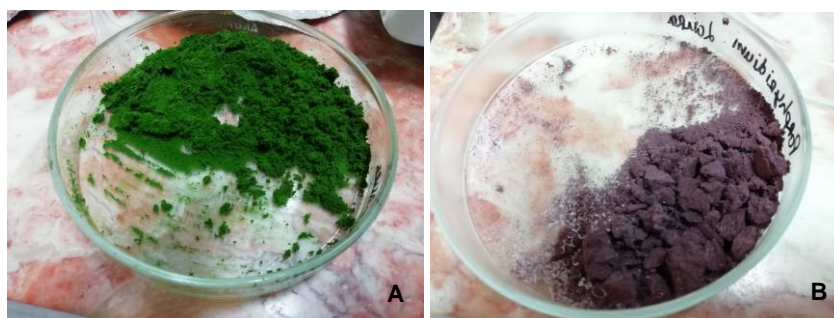


Figura 2.5 - Fotografia de placas de petri com biomassa liofilizada; A - *Chlorella vulgaris*; B - *Porphyridium purpureum*.

e) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES TOTAIS

Para determinação do teor de açúcares totais realizou-se uma extração em duplicado e determinação em triplicado. Primeiramente, as amostras de microalgas liofilizadas foram submetidas a um pré-tratamento, por hidrólise ácida (Hoebler *et al.*, 1989) de forma a extrair os açúcares presentes nas microalgas e conseguir uma quantificação efetiva dos mesmos. Esta quantificação ocorre por determinação colorimétrica, baseada no método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), no qual a amostra entra em contacto com ácido sulfúrico, que provoca a hidrólise dos polissacáridos em monossacáridos, os quais reagem com o fenol levando ao aparecimento de uma cor alaranjada na solução (**Figura 2.6**). Deste modo, é possível fazer a quantificação do açúcar presente na amostra por meio indireto, comparando com uma reta de calibração determinada em função de diferentes soluções com concentrações de glucose, conhecidas através de análise espectrofotométrica, fazendo leituras a 490 nm.

O processo utilizado foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 100 mg de biomassa liofilizada para dentro de um tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico com uma concentração de 72% (m/m) à amostra;
2. Colocou-se o tubo de ensaio num banho termoestático a 30°C durante uma hora;
3. Retirou-se o tubo do banho e transferiu-se o conteúdo para um frasco rolhado de 250 mL;
4. Adicionou-se 139 mL de água *Millipore*, para uma concentração de ácido sulfúrico de 4% (m/m);

5. Agitou-se a amostra;
6. Fechou-se o frasco e levou-se à autoclave durante uma hora a 120°C e 1.4 bar;
7. Retirou-se uma amostra do frasco e filtrou-se com o auxílio de um filtro com 13 mm de diâmetro e 0.22 µm de porosidade (MS® CA Syringe Filter);
8. Diluíram-se, em água *Millipore*, as amostras pré-tratadas, de modo a obter valores para a concentração de açúcares semelhantes aos valores utilizados na reta de calibração, transferindo para um tubo de ensaio 0.5 mL de amostra e 0.5 mL de água *Millipore*;
9. Preparou-se uma solução aquosa de fenol com uma relação 5% (peso/volume), isto é, diluiu-se 5 g de fenol em 100 mL de água *Millipore*;
10. Adicionou-se 1 mL da solução de fenol a cada tubo;
11. Adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e agitou-se no vortex de forma a homogeneizar;
12. Deixou-se a reação a ocorrer durante 20 min, à temperatura ambiente, e depois colocaram-se os tubos de ensaio dentro de um banho de água fria, durante 10 min, de modo a arrefecer;
13. Fez-se a leitura da absorvância de cada uma das amostras num espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 490 nm, contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água *Millipore*, e submetida ao mesmo tratamento.

Para correta determinação dos açúcares presentes nas microalgas, foi necessário construir uma reta de calibração, seguindo o presente método:

1. Preparou-se uma solução padrão de glucose com uma concentração de 0.1 g/L;
2. Fizeram-se cinco diluições a partir da solução padrão de glucose preparada no ponto 1, com concentrações entre 0.01 g/L e 0.08 g/L, de forma a construir a reta de calibração;
3. Transferiu-se 1 mL de cada solução padrão para um tubo de ensaio;
4. Trataram-se as soluções de igual forma às amostras a partir do ponto 9, à exceção do ponto 12, fazendo a leitura em triplicado.

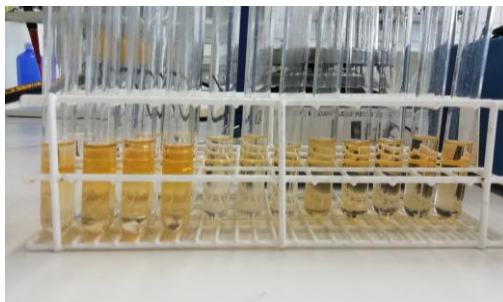


Figura 2.6 - Fotografia do gradiente de cor típico do método utilizado para determinação do teor em açúcares.

f) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM PROTEÍNAS TOTAIS

O método utilizado para determinação do teor de proteínas totais foi adaptado de Lowry *et al.* (1951), e é um método de elevada sensibilidade (Markwell *et al.*, 1978). O procedimento envolve duas

reações químicas, sendo a primeira a reação de Biureto, envolvendo a redução do íon cobre (II) em condições alcalinas e a formação de um complexo com ligações peptídicas, e a segunda a redução do reagente Folin-Ciocalteu pelo complexo formado na primeira reação, sendo esta a reação que provoca a mudança de cor da solução (**Figura 2.7**). Primeiramente, a biomassa liofilizada foi submetida a um pré-tratamento, envolvendo hidróxido de sódio e temperatura, para expor as proteínas e alcalinizar o meio, uma vez que as proteínas precipitam em meio ácido. Deste modo, é possível fazer a quantificação das proteínas presentes na amostra por meio indireto, comparando com uma reta de calibração determinada em função de diferentes soluções com concentrações de albumina bovina sérica, conhecidas através de análise espectrofotométrica, fazendo leituras a 750 nm.

Para a determinação do teor em proteínas, a extração foi realizada em duplicado e a determinação em triplicado, de acordo com o seguinte método:

1. Pesou-se 5 mg de biomassa de cada espécie de microalga para tubos de centrífuga HACH;
2. Adicionou-se 4.0 mL de NaOH 1.0 N e aqueceu-se em banho-maria ($\pm 100^\circ\text{C}$) durante 1 h;
3. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente (e depois em água corrente);
4. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 30 min;
5. Retirou-se 0.5 mL de extrato alcalino (sobrenadante) para um tubo de ensaio;
6. Adicionou-se 5.0 mL de Reagente A (**Anexo 3**), agitando no vortex e deixando repousar 10 min no escuro;
7. Adicionou-se 0.5 mL de Reagente B (**Anexo 3**), agitando no vortex e deixando repousar 30 min no escuro;
8. Leu-se a amostra no espectrofotômetro a 750 nm contra um branco (solução de NaOH 1.0 N (sem a biomassa) sujeito ao mesmo pré-tratamento);

Para correta determinação das proteínas presentes nas microalgas, foi necessário construir uma reta de calibração, seguindo o presente método:

1. Preparou-se uma solução padrão de albumina bovina sérica com uma concentração de 1 g/L;
2. Fizeram-se cinco diluições a partir da solução padrão de albumina preparada no ponto 1, com concentrações entre 0.025 g/L e 0.5 g/L, de forma a construir a reta de calibração;
3. Transferiu-se 0.5 mL de cada solução padrão para um tubo de ensaio;
4. Trataram-se as soluções de igual forma às amostras a partir do ponto 6, fazendo a leitura em triplicado.

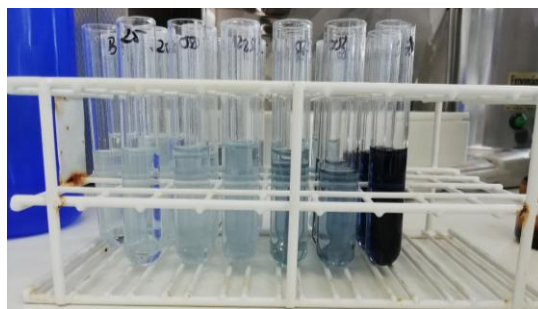


Figura 2.7 - Fotografia do gradiente de cor típico do método utilizado para determinação do teor em proteínas.

g) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM LÍPIDOS TOTAIS

Para determinação do teor em lípidos totais foi utilizado um procedimento adaptado de Bligh e Dyer (1959), método que permite a extração e purificação de lípidos num só processo. Este método baseia-se na largamente utilizada extração utilizando clorofórmio, metanol e água, e observação e estudo das fases formadas por estes. A partir deste estudo, Bligh e Dyer (1959) formularam a hipótese de que uma extração lipídica ótima resultaria numa primeira mistura homogênea entre a amostra, clorofórmio, água e metanol que, quando diluída com água ou clorofórmio, provocava um desequilíbrio de concentrações, formando uma solução bifásica (**Figura 2.8-A**). Nesta solução, a fase com clorofórmio contém os lípidos, sendo a fase que interessa isolar, e a fase metanol-água corresponde à fase não lipídica.

Para a determinação do teor em lípidos, o processo foi realizado em triplicado, de acordo com o seguinte método:

1. Pesou-se 100 mg de biomassa de cada espécie para um tubo de centrífuga HACH;
2. Adicionou-se 5 mL de solução monofásica (**Anexo 3**), agitando-se no vortex;
3. Agitou-se a mistura, a temperatura ambiente durante 1 hora, num agitador orbital;
4. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 minutos, e recolheu-se a fase líquida, contabilizando-se sempre o volume retirado;
5. Realizaram-se 4 extrações, isto é, os passos 2-4 repetiram-se 4 vezes;
6. Adicionou-se o volume necessário de clorofórmio e água para obter uma proporção final metanol/clorofórmio/água de 2:2:1.8 (v/v/v), para provocar a separação de fases (**Figura 2.8-A**);
7. Deixou-se repousar, devidamente coberto com folha de alumínio, *overnight*, permitindo uma eficaz separação de fases;
8. Recuperou-se a fase inferior, isto é, a fase contendo clorofórmio e lípidos;
9. Filtrou-se com algodão e sulfato de sódio anidro para um balão previamente tarado (105°C, 1 hora) e pesado;
10. Colocou-se o balão no evaporador rotativo a baixa pressão, com um banho termostático a 40°C, iniciando-se a destilação do solvente;
11. Retirou-se cada balão do aparelho de destilação e colocou-se na estufa, a 30°C, durante 1h30, de forma a remover os últimos traços de solvente;

12. Colocou-se o balão num exsicador a arrefecer até à temperatura ambiente, pesando-se de seguida (**Figura 2.8-B e 2.8-C**);

Repetiu-se os passos 11 e 12 até se obter um peso constante para cada balão, diminuindo o tempo na estufa para 30 minutos em cada repetição. Atingido o peso constante, determinou-se o teor de lípidos através da seguinte expressão:

$$\text{Teor de lípidos (g/100g ps)} = \frac{m_{\text{balão+ lípidos}} - m_{\text{balão}}}{m_{\text{microalga}}}$$

onde $m_{\text{balão + lípidos}}$ representa a massa do balão incluindo a massa dos lípidos extraídos, $m_{\text{balão}}$ a massa do balão vazio e tarado (105°C, 1 hora) e $m_{\text{microalga}}$ a massa de microalga utilizada no processo de extração.

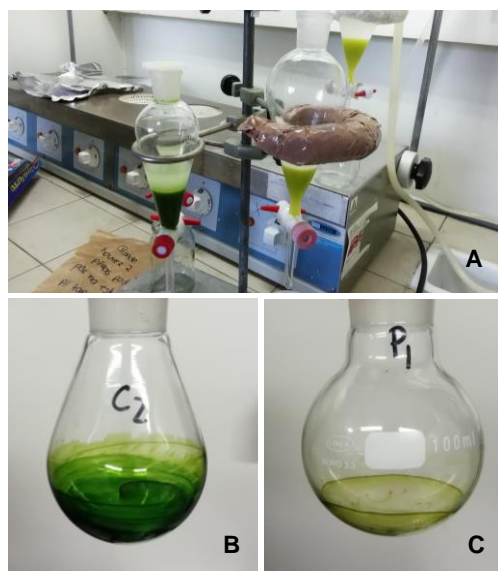


Figura 2.8 - Esquematização do protocolo de determinação do teor em lípidos. A - solução bifásica; B - óleo extraído de *C. vulgaris*; C- óleo extraído de *P. purpureum*.

h) TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS DE BIOMASSA MICROALGAL LIOFILIZADA

Optou-se por repetir o processo de determinação do teor de sólidos totais e de minerais mas, desta vez, utilizando biomassa liofilizada. Para tal, repetiram-se todos os passos enunciados em **b) TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E DE MINERAIS 1**, alterando apenas o processo 2, no qual se pesou 100 mg de biomassa de *C. vulgaris* e 30 mg de biomassa de *P. purpureum*. O processo foi, também, realizado em duplicado.

2.2. GELADO

2.2.1. FORMULAÇÃO DO PRODUTO ALIMENTAR

Para testar a incorporação de microalgas num gelado, otimizar as características organoléticas e funcionais do produto, bem como avaliar o seu perfil nutricional e sensorial, optou-se por produzir um gelado de nata *standard*, composto por natas, leite, e açúcar, totalizando um volume de cerca de 500 mL.

Inicialmente foi elaborada uma formulação controlo (N1), à qual não foi adicionada biomassa microalgal, tendo como objetivo testar a formulação e servir de controlo para as análises nutricionais e sensoriais, utilizando o seguinte procedimento (**Figura 2.9**):

1. Pesou-se e doseou-se cada ingrediente, utilizando 200 mL de natas (Longa Vida – Nestle), 100 mL de leite meio gordo (Auchan) e 100 g de açúcar (Delta cafés);
2. Procedeu-se à batadura das natas, utilizando uma batedeira KENWOOD Chefette HM 680, na potência 2, adicionando o açúcar até estas se encontrarem firmes, e os dois ingredientes homogeneizados;
3. Incorporou-se o leite e homogeneizou-se, novamente, a mistura;
4. Adicionou-se, a um copo de mistura congelado a -18°C, de uma máquina própria para confeção de gelados, já em rotação;
5. A mistura esteve em congelação durante 15 minutos até atingir a textura desejada;
6. Após este período, transferiu-se a mistura congelada para uma caixa de plástico, própria para congelação, que foi, seguidamente, acondicionada numa arca congeladora a -18°C, para endurecimento e armazenamento.

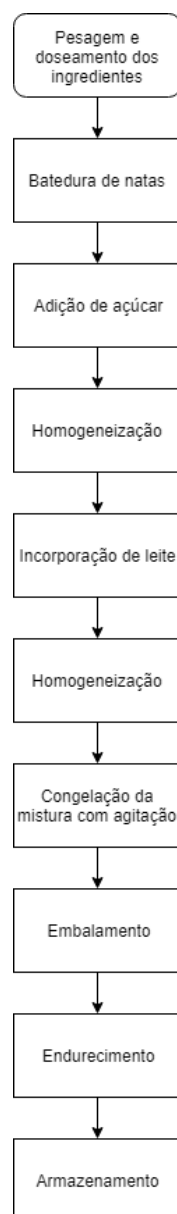


Figura 2.9 - Fluxograma da produção do gelado de nata controlo; primeira formulação.

Desenvolvida a primeira formulação, foram produzidas outras duas, incorporando microalgas, optando-se por incorporá-las frescas, isto é, utilizando diretamente o concentrado obtido da colheita da biomassa.

Assim, mantendo o processo anterior, foram produzidos dois gelados contendo microalgas, um com a adição de 5 mL, correspondendo aproximadamente a 5 g, de *C. vulgaris* (formulação C1), e outro com 10 mL, correspondendo aproximadamente a 10 g, de *P. purpureum* (formulação P1). É de realçar que as diferenças entre volumes de concentrado se devem à quantidade de biomassa colhida até ao momento de confeção, bem como devido ao odor do concentrado de *C. vulgaris*, receando-se um grande impacto organolético. Este concentrado de microalgas foi adicionado ao leite (ponto 3 do processo) antes de este ser incorporado na mistura, para melhor homogeneização e distribuição dos microrganismos por toda a mistura.

Num período mais avançado do trabalho, após análise sensorial das primeiras formulações, e seguindo as sugestões dos inquiridos, decidiu-se diminuir a quantidade de açúcar e aumentar o volume de microalgas.

Assim, mantendo todo o processo anterior, reduziu-se o açúcar em 20%, adicionando 80 g, produzindo um novo gelado controlo (formulação N2) e duplicou-se o volume de microalgas, passando a adicionar 10 mL, correspondendo aproximadamente a 10 g, de *C. vulgaris* (formulação C2) e 20 mL, correspondendo aproximadamente a 20 g, de *P. purpureum* (formulação P2), novamente incorporando-as no leite (ponto 3 do processo).

2.2.2. ANÁLISE DA COR DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS

Seguindo o mesmo procedimento contemplado no ponto **a)** da secção **2.1.2.** foi feita a análise colorimétrica das várias formulações de gelado produzidas, com o intuito de verificar a alteração da cor do produto após a adição de biomassa proveniente de microalgas.

2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS

Por forma a avaliar se a adição de microalgas modificou as propriedades nutricionais das várias formulações de gelado, foram realizadas diversas análises aos seus macroconstituintes e ao conteúdo mineral.

a) ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS

Para determinar o conteúdo mineral das formulações produzidas, utilizou-se o método de espectrometria de fluorescência de radiação-X (XRF), tal como descrito no ponto **b)** da secção **2.1.3.**, repetindo o protocolo. Uma vez que a finalidade deste processo é análise das formulações de gelado, no ponto 1 do processo anteriormente enunciado, o concentrado de microalgas foi substituído por gelado, sendo analisado também em triplicado.

b) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM AÇÚCARES TOTAIS

A quantificação, realizada em triplicado, do teor em açúcar, nomeadamente sacarose, das várias formulações de gelado teve por base a determinação colorimétrica, utilizando o método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), tal como descrito anteriormente no ponto **e)** da secção **2.1.3.** Para este efeito, as várias formulações de produto alimentar foram sujeitas a um pré-tratamento, devido à elevada concentração de produto. Para este processo foi construída uma reta de calibração utilizando diferentes soluções com concentrações de sacarose, conhecidas através de análise espectrofotométrica, fazendo leituras a 490 nm.

Segue-se a descrição do processo:

1. Pesou-se 150 mg de cada formulação de gelado para balões volumétricos de 500 mL, aferindo-se o volume com água *Millipore*;
2. Retirou-se uma amostra do balão e filtrou-se com o auxílio de um filtro com 13 mm de diâmetro e 0.22 µm de porosidade (MS® CA Syringe Filter);
3. Recolheu-se 1 mL de cada amostra filtrada para tubos de ensaio;
4. Repetiram-se os pontos 9-13 tal como descrito no ponto **e)** da secção **2.1.3**.

Para correta determinação dos açúcares presentes nos gelados produzidos, foi necessário construir uma reta de calibração, seguindo o presente método:

1. Preparou-se uma solução padrão de sacarose com uma concentração de 0.1 g/L;
2. Fizeram-se cinco diluições a partir da solução padrão de sacarose preparada no ponto 1, com concentrações entre 0.01 g/L e 0.075 g/L, de forma a construir a reta de calibração.
3. Transferiu-se 1 mL de cada solução para um tubo de ensaio;
4. Trataram-se as soluções de igual forma às amostras a partir do ponto 9, à exceção do ponto 12, fazendo a leitura em triplicado (descrito no ponto **e)** da secção **2.1.3**).

c) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM PROTEÍNAS TOTAIS

O teor de proteínas totais das formulações de gelado foi determinado através do método de Kjeldahl (Helrick, 1990), adaptado, processo relativamente preciso, que permite quantificar indiretamente o conteúdo total de proteína através do azoto presente nas amostras com matéria orgânica. Este método divide-se em três fases: digestão, destilação e análise volumétrica. A digestão produz iões de amónio a partir do azoto presente nas amostras, na destilação dá-se a transferência dos iões de amónio para um recipiente com uma solução mista de indicadores através da produção de amónia, e de seguida faz-se a análise volumétrica dos iões de amónio presentes na solução mista de indicadores.

O procedimento utilizado foi o seguinte, tendo sido realizado em duplicado:

1. Transferiu-se 1 mL de amostra para dentro de um tubo de digestão com 4 mL água *Millipore*;
2. Adicionou-se 50 mL de reagente de digestão (**Anexo 3**) e iniciou-se o processo de digestão. Para além das amostras, fez-se um ensaio em branco com 5 mL de água *Millipore* e 50 mL de reagente de digestão;
3. Deixou-se decorrer o processo de digestão durante cerca de seis horas, até a amostra adquirir uma cor amarelo palha;
4. Após este processo, adicionou-se cerca de 100 mL de água *Millipore* e 4 gotas de fenolftaleína a cada uma das amostras;
5. Adicionou-se 50 mL de hidróxido de sódio, de modo a neutralizar a acidez do ácido sulfúrico ainda presente na amostra;
6. Colocaram-se as amostras digeridas na unidade de destilação e iniciou-se o processo recorrendo a um *erlenmeyer* com 50 mL de ácido bórico com uma solução mista de indicadores (**Anexo 3**);

7. Titulou-se esta solução com uma solução titulante padrão (**Anexo 3**).

A determinação do conteúdo em proteína da amostra foi realizada através da utilização das seguintes expressões:

$$Azoto (g/100g) = \frac{(V_a - V_b) \times N_{tit} \times 0.014}{m_{gelado}} \times 100$$

$$Proteína(g/100g) = Azoto \times FCAP$$

tendo V_a e V_b como volume de titulante necessário para titular a amostra e o volume branco, respetivamente, N_{tit} a concentração da solução aquosa de ácido sulfúrico titulante, m_{gelado} a massa de amostra de gelado utilizada e FCAP, o fator de conversão do conteúdo em azoto em conteúdo de proteína. O valor utilizado para o FCAP foi 6.38 g/g azoto total.

d) DETERMINAÇÃO DO TEOR EM LÍPIDOS TOTAIS

A determinação do teor de lípidos totais foi feita recorrendo ao método de separação gravimétrica líquido-líquido, adaptado do método 1664 (USEPA, 1998), utilizando o reagente hexano como solvente de extração. Posteriormente utilizou-se o destilador rotativo, para eliminar o reagente e procedeu-se à pesagem de balões para determinação do teor lipídico. Este processo baseia-se na formação de várias fases aquando da junção do hexano com a matéria orgânica, nomeadamente a fase lipídica composta pelo solvente de extração e lípidos, e a fase não lipídica.

Este processo foi realizado em duplicado, seguindo o protocolo descrito abaixo:

1. A uma ampola de decantação, adicionou-se 30 mL de amostra de gelado, juntamente com 30 mL de hexano, agitando-se;
2. Deixou-se repousar para que se formassem várias fases;
3. Recuperou-se a fase hexano-lípidos, voltando a adicionar 30 mL de hexano às restantes fases, agitando-se;
4. Deixou-se repousar, novamente, para separação de fases;
5. Recuperou-se a fase hexano-lípidos, repetindo o processo mais uma vez, ou até a fase hexano-lípidos deixar de ter uma ligeira coloração típica dos óleos;
6. Previamente tarou-se (105°C durante 1 hora) e pesou-se balões para utilização num destilador rotativo;
7. Filtrou-se a fase hexano-lípidos para os balões e seguiu-se o processo de destilação do solvente, a baixa pressão, com um banho termostático a 40°C;
8. Retirou-se cada balão do aparelho de destilação e colocou-se na estufa, a 105°C, durante 1h30, de forma a remover os últimos traços de solvente;

9. Colocou-se o balão num exsiccador a arrefecer até à temperatura ambiente, pesando-se de seguida;

Repetiu-se os passos 8 e 9 até se obter um peso constante para cada balão, diminuindo o tempo na estufa para 30 minutos em cada repetição. Atingido o peso constante, determinou-se o teor de lípidos através de um procedimento já enunciado no ponto **g)** da secção **2.1.3**, substituindo $m_{\text{microalga}}$ por m_{gelado} .

2.2.4. ELABORAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL

Para elaboração do perfil nutricional das formulações desenvolvidas, nomeadamente teor lipídico, proteico, de açúcares e minerais, recorreu-se aos resultados obtidos ao longo dos procedimentos que constam na secção **2.2.2**, bem como ao regulamento (UE) nº 1924/2006 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2007) e ao regulamento (UE) nº 1169/2011 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011), com o intuito de determinar a percentagem correspondente do valor de referência do nutriente.

2.2.5. ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA

Com a finalidade de avaliar a aceitabilidade dos gelados desenvolvidos por parte dos consumidores, bem como obter uma avaliação de determinados atributos (aspeto, cor, cheiro, textura, sabor, apreciação global) das várias formulações, foi aplicado um questionário que incluía uma prova de medição do grau de satisfação e uma prova de aceitação. A folha de prova encontra-se no **Anexo 2**.

Análise sensorial, ou exame organolético, é um método cuja finalidade é medir, analisar e interpretar as respostas a produtos através dos sentidos, ou seja, através da perceção da visão, olfato, gosto, audição e tato, estabelecendo relações específicas entre resultados, sendo essencial no processo de desenvolvimento de um novo produto alimentar (Lawless e Heymann, 2010). Encontra-se, no projeto de Norma Portuguesa 4263 (1994) (de Noronha, 2003), a seguinte definição de análise sensorial: “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”. Esta análise responde a três questões, representando, cada uma, um tipo de teste: descrição (testes descritivos), discriminação (testes discriminativos), e preferência ou hedónico (testes hedónicos) (de Noronha, 2003).

Para a execução deste trabalho, realizou-se uma prova hedónica, tendo sido aplicada em dois momentos, e contemplou-se duas avaliações, de preferência e de aceitabilidade. No teste de preferência é medido o grau de satisfação e, no caso de serem apresentadas mais de duas amostras, os inquiridos devem estabelecer uma classificação. No caso do teste de aceitabilidade, é quantificado o grau de preferência através de uma escala categorizada quanto ao gosto (Drake, 2007). As escalas utilizadas na realização deste tipo de provas denominam-se escalas hedonistas, sendo, por norma, compostas por nove pontos, sendo 1 o mínimo e 9 o máximo (Drake, 2007).

Para a correta execução de uma análise sensorial, existem condições que devem ser cumpridas, estando contempladas na NP 4258:1993 (de Noronha, 2003), de forma a recolher respostas o mais

exatas possível. De forma breve, incluem: ambiente limpo e sem odores, bem iluminado e com todo o equipamento necessário; temperatura controlada e confortável, adequando ao produto em análise. As amostras examinadas devem ser apresentadas de modo aleatório e com um código composto por três dígitos, e o painel de provadores é, normalmente, composto por 50 a 100 (de Noronha, 2003; Drake, 2007). Relativamente à hora em que a prova se deve realizar, a mais indicada é aquela em que o provador está mais acordado e com as suas capacidades cognitivas mais apuradas, sendo recomendado realizar-se entre as 10 horas da manhã e a hora do almoço, ou então ao fim da tarde (de Noronha, 2003).

Durante a execução deste trabalho, a primeira prova hedónica foi realizada nas instalações do Departamento de Ciências da Terra da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, nomeadamente no Laboratório Agroindustrial, na qual foram avaliadas as primeiras três formulações produzidas contando com uma amostra de 43 indivíduos, de ambos os sexos (F = 46.51% e M = 53.49%), com idades compreendidas entre os 18 e os 54 anos, e uma média de idades \bar{x} = 25.77 anos. A segunda prova foi realizada, também na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, no âmbito do 4º Simpósio de Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, na qual foram avaliadas as segundas três formulações produzidas, isto é, com redução de açúcar e aumento do volume de microalgas, contando com uma amostra de 41 indivíduos, de ambos os sexos (F = 63.41% e M = 36.59%), com idades compreendidas entre os 18 e os 63 anos, e uma média de idades \bar{x} = 30.02 anos. Na primeira análise sensorial utilizaram-se os códigos de prova: gelado N1 – 135; gelado C1 – 724; gelado P1 – 262. A segunda prova contou com os seguintes códigos de prova: gelado N2 – 214; gelado C2 – 573; gelado P2 – 925.

2.2.6. ELABORAÇÃO DO PERFIL SENSORIAL

Com base nos resultados adquiridos nas provas de análise sensorial hedónica, tornou-se possível ir de encontro a um dos objetivos do trabalho, nomeadamente a elaboração do perfil sensorial de cada uma das formulações desenvolvidas. Para tal, o *software* escolhido foi Microsoft Excel ® 2010, e baseou-se na avaliação de cada um dos atributos do produto, sujeitos a avaliação por parte do consumidor.

2.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados realizou-se recorrendo ao *software* Microsoft Excel ® 2010, para executar uma análise de variância (ANOVA) com fator único, que avalia a existência de diferenças significativas entre as amostras, utilizando-se um nível de significância de 5%. A análise de variância foi complementada com o teste de Tukey de modo a avaliar a existência de diferenças significativas entre as amostras. Na análise de dados multivariados utilizou-se o *software* EZR ®, calculando-se frequências absolutas e relativas de variáveis qualitativas, enquanto para as variáveis quantitativas calculou-se medidas de dispersão (desvio padrão) e medidas de localização (média). Na associação estatística, recorreu-se ao Teste do Qui-Quadrado e ao Teste de Kruskal-Wallis, assumindo um Intervalo de Confiança (IC) de 95% ($p \leq 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Face à metodologia utilizada, apresentam-se, de seguida, os resultados do trabalho experimental e sua respetiva discussão. Em primeiro lugar surgem os resultados referentes às culturas de microalgas e sua biomassa, nomeadamente monitorização e caracterização das mesmas e, seguidamente, os resultados das análises realizadas às várias formulações de gelados produzidas, nomeadamente a sua caracterização e análise sensorial.

3.1. MICROALGAS

3.1.1. MONITORIZAÇÃO DAS CULTURAS

Tal como descrito no ponto **a)** da secção **2.1.2**, o crescimento das duas espécies de microalgas em estudo foi monitorizado através de análises colorimétricas feitas em vários momentos do período de tempo destinado ao crescimento das culturas. Nas seguintes tabelas (**Tabelas 3.1 e 3.2**) apresenta-se o resultado da análise colorimétrica feita no primeiro dia de cultura (tempo 0) e no último dia de cultura, antes da primeira colheita (tempo 35).

Tabela 3.1 - Valores médios \pm DP dos parâmetros medidos na análise colorimétrica, no Tempo 0 (0 dias) e no Tempo 35 (35 dias) de cultura, correspondentes à espécie *Chlorella vulgaris*; L* - luminosidade (preto-branco); a* - verde-vermelho; b* - azul-amarelo; C* - saturação; h° - tonalidade; DP – desvio-padrão; As letras diferentes (a – b) em cada linha representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado parâmetro no tempo.

	<i>C. vulgaris</i>	
	Tempo 0	Tempo 35
L*	23.7 \pm 1.0 ^a	25.0 \pm 1.5 ^a
a*	-0.6 \pm 0.1 ^b	-0.9 \pm 0.1 ^a
b*	2.0 \pm 0.4 ^a	1.5 \pm 0.5 ^a
C*	2.1 \pm 0.4 ^a	1.7 \pm 0.4 ^a
h°	108.2 \pm 5.0 ^a	124.0 \pm 9.5 ^a

Tabela 3.2 - Valores médios \pm DP dos parâmetros medidos na análise colorimétrica, no Tempo 0 (0 dias) e no Tempo 35 (35 dias) de cultura, correspondentes à espécie *Porphyridium purpureum*; L* - luminosidade (preto-branco); a* - verde-vermelho; b* - azul-amarelo; C* - saturação; h° - tonalidade; DP – desvio-padrão. As letras diferentes (a – b) em cada linha representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado parâmetro no tempo.

	<i>P. purpureum</i>	
	Tempo 0	Tempo 35
L*	21.0 \pm 0.7 ^a	17.1 \pm 0.3 ^b
a*	-0.0 \pm 0.1 ^a	0.1 \pm 0.0 ^a
b*	1.1 \pm 0.1 ^a	1.2 \pm 0.1 ^a
C*	1.1 \pm 0.1 ^a	1.2 \pm 0.1 ^a
h°	92.1 \pm 3.6 ^a	87.3 \pm 1.4 ^a

Uma vez que esta análise se baseou no princípio de que a cor das culturas se altera com o tempo e crescimento, escurecendo, procurou-se verificar se tal era corroborado pelos resultados desta análise, resultando em diferenças significativas nos valores dos diferentes tempos de cultura (**Tabelas 3.1 e 3.2**). No caso de *C. vulgaris*, a tonalidade da cor (h°) encontra-se entre as cores básicas amarelo (h°=90°) e verde (h°=180°) (Loskotova, n.d.), aproximando-se da última com o passar do tempo, devido a uma maior concentração de biomassa, correspondendo a crescimento da cultura, e a variável a* apresenta valores negativos, o que corresponde à cor verde, típica desta espécie de microalga (Batista *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 1996; Gouveia e Empis, 2003). Este último parâmetro é o único que apresenta variações significativas, com um nível de confiança de 95% ($p \leq 0.05$) (**Tabela 3.1**). Uma vez que, relativamente ao parâmetro a*, a cor verde é representada por valores negativos e a cor vermelha por valores positivos, observando os resultados presentes na referida **Tabela 3.1**, é de notar que os valores deste parâmetro se afastam de 0 com o tempo de crescimento, sendo esta mais uma evidência de que a cor verde é reforçada com o aumento de biomassa microalgal. Estudando os resultados da espécie *P. purpureum* (**Tabela 3.2**), é de notar que a sua tonalidade (h°) se apresenta próxima do valor correspondente à cor amarela (h°=90), diminuindo com o passar do tempo, isto é, aproximando-se do valor correspondente à cor vermelha (h°=0) (Loskotova, n.d.). Já o seu parâmetro a* apresenta-se positivo, correspondendo à cor vermelha, típica desta microalga (Geresh *et al.*, 2002), e a sua variável b*, igualmente positiva, corresponde à cor amarela, justificando a variação da tonalidade. Ao analisar as variáveis em ANOVA, não foram encontradas variações significativas exceto no parâmetro L*, que corresponde à luminosidade, obtendo-se evidência de que existe diferença significativa, com uma confiança de 95% ($p \leq 0.05$), entre valores do parâmetro em causa (**Tabela 3.2**). Esta diferença significativa condiz com o aumento de opacidade e escurecimento da cultura, como é possível observar na **Figura 2.1** da secção 2.1.1, comprovando um aumento de biomassa.

Outra técnica utilizada para monitorização do crescimento, e também da pureza das culturas, foi a microscopia ótica. Esta técnica permitiu, por observação, ter uma noção do aumento do número de células de microalgas ao longo do tempo, apesar de não se ter obtido um número certo, uma vez que

não se fez contagem por falta de hemacitômetro, bem como a ausência de espécies que poriam em causa a pureza das culturas.

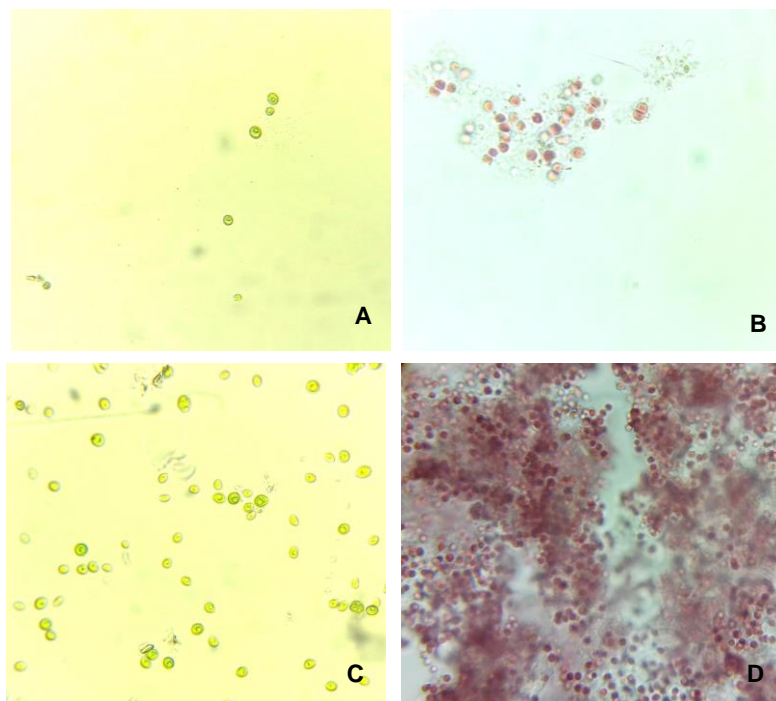


Figura 3.1 - Fotografias das culturas de microalgas, com ampliação A=500x, tiradas através do microscópio ótico, em 2 tempos de crescimento das espécies (dia 0 e dia 35). A - *C. vulgaris* Tempo 0; B - *P. purpureum* Tempo 0; C - *C. vulgaris* Tempo 35; D - *P. purpureum* Tempo 35.

Tal como é observável na **Figura 3.1**, a concentração de células aumentou substancialmente do Tempo 0 para o Tempo 35, em ambas as espécies de microalgas, sendo mais visível na **Figura 3.1-D**, correspondente ao dia 35 de *Porphyridium purpureum*.

Além de se ter verificado que não houve contaminação das culturas, foi possível observar que a espécie *P. purpureum* apresenta um comportamento diferente de *C. vulgaris*, na medida em que as suas células se agregam com o aumento da concentração de biomassa, enquanto as de *C. vulgaris* permanecem isoladas. Pode-se depreender que a facilidade da colheita de biomassa de *P. purpureum*, através da técnica utilizada (sedimentação seguida de centrifugação), se deve, em parte, a este comportamento favorável da microalga.

3.1.2. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A técnica de espectrofotometria, que auxiliou na monitorização do crescimento das culturas, permitiu a obtenção de espectros de absorção que traduzem o aumento de clorofilas e carotenóides presentes. Uma vez que não foi feita extração destes compostos, não é possível fazer uma correta quantificação dos mesmos, tornando os gráficos seguintes meramente informativos e ilustrativos da aplicação da técnica. Apesar deste facto, tornou-se possível identificar alguns picos de absorção que correspondem, potencialmente, a pigmentos que caracterizam as microalgas em estudo. Realça-se que

podem existir interferências do meio de cultura no espectro, apesar de ter sido feita a devida correção, utilizando meio de cultura como branco (“auto-zero”).

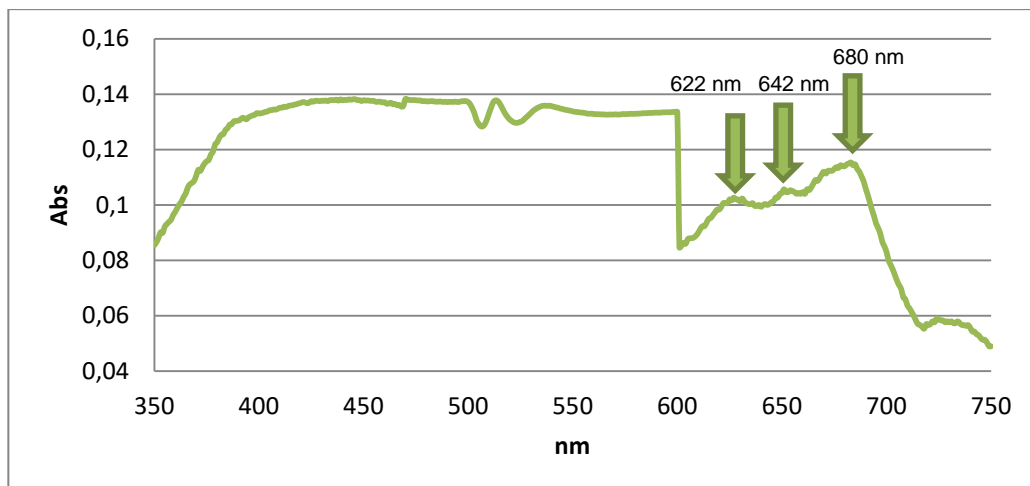


Figura 3.2 - Gráfico ilustrativo do espectro de absorção da cultura de *C. vulgaris* no dia 0 de cultura. Abs – absorvância medida; nm – comprimento de onda.

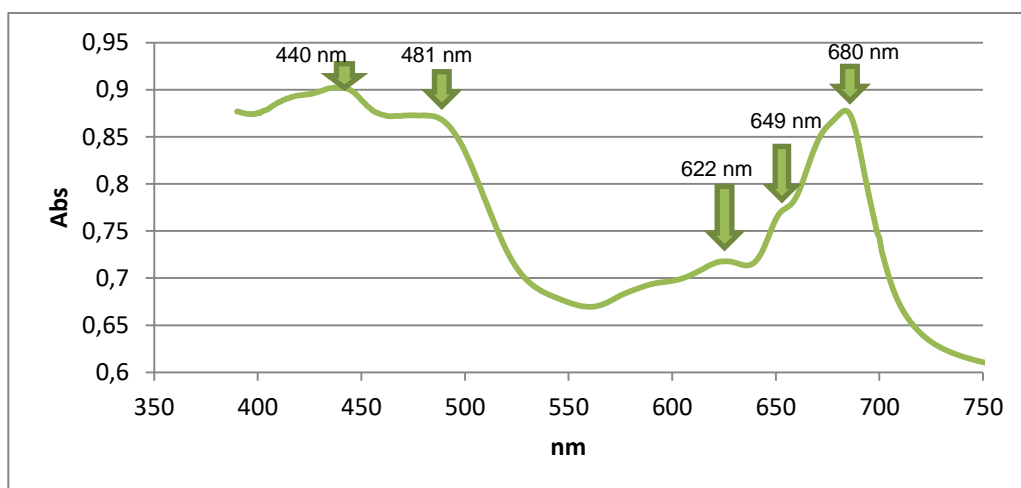


Figura 3.3 - Gráfico ilustrativo do espectro de absorção da cultura de *C. vulgaris* no dia 35 de cultura. Abs – absorvância medida; nm – comprimento de onda.

Tal como é perceptível através do estudo dos gráficos presentes nas **Figuras 3.2 e 3.3**, existe uma grande diferença nos valores de absorvância nos dois tempos de cultura. O primeiro gráfico mostra valores bastante menores e uma forma muito pouco definida, comparativamente com o segundo gráfico, o que traduz a diferença nas concentrações de biomassa no início de cultura e no fim. Logicamente, no primeiro dia de cultura existe muito pouca biomassa e, por isso, uma concentração diminuída de pigmentos, o que já não acontece no final do período de crescimento, onde existe uma elevada concentração de biomassa e, consequentemente, de pigmentos. Segundo Lichtenthaler e Buschmann (2005), o espectro de absorção das clorofilas a e b encontra-se entre 400 e 700 nm, tendo a clorofila a absorção máxima entre 428 e 432 nm correspondendo à banda azul do espectro de luz, e entre 660 e 665 nm correspondendo à zona vermelha do espectro de luz. O mesmo ocorre com a clo-

rofila b, variando entre 452 e 469 nm, e entre 642 e 652 nm, respetivamente. Segundo os mesmos autores, os carotenoides possuem um espectro de absorção máxima entre 400 e 500 nm. Assim, tendo em conta esta informação, é possível observar, no gráfico da **Figura 3.2**, três ligeiros picos de absorção entre os 600 e 700 nm. Os dois primeiros correspondem aos comprimentos de onda de 622 e 642 nm, encontrando-se dentro dos máximos de absorção das duas clorofilas (Lichtenthaler e Buschmann, 2005), e um terceiro o pico de absorção nos 680 nm. Tal como no gráfico da **Figura 3.2**, encontram-se três picos de absorção entre os 600 e os 700 nm na **Figura 3.3**, sendo dois deles muito ligeiros e correspondendo aos comprimentos de onda 620 e 649 nm, que se encontram dentro dos valores de absorção máxima das clorofilas a e b (Lichtenthaler e Buschmann, 2005) e um terceiro o pico de absorção nos 680 nm que se pode relacionar com a clorofila a (Glow, n.d.). Este segundo gráfico já torna mais legível a possível presença de carotenoides na cultura, mostrando dois ligeiros picos de absorção correspondentes aos comprimentos de onda 440 e 481 nm, comprimentos de onda que se encontram dentro do espectro de absorção máxima dos carotenoides (Lichtenthaler e Buschmann, 2005).

Relativamente ao espectro de absorvância de *Porphyridium purpureum*, este apresentou-se muito diferente do de *C. vulgaris*, tal como esperado, uma vez que possui diferentes pigmentos e, tal como é possível observar olhando para as culturas, cor diferente. No gráfico da **Figura 3.4**, é notório que se trata de uma cultura em início de crescimento, possuindo valores de absorvância muito baixos, característicos de baixas concentrações de biomassa. Ainda assim, é possível distinguir três ligeiros picos de absorvância, um deles dentro do espectro de absorção máxima dos carotenoides (Lichtenthaler e Buschmann, 2005), correspondendo a 449 nm, o segundo correspondendo a 573 nm, podendo relacionar-se com as ficobiliproteínas, nomeadamente ficoeritrina (540-570 nm) (Román *et al.*, 2002), características desta microalga, e o terceiro pico encontra-se nos 683 nm, à semelhança dos gráficos de *C. vulgaris*, uma vez que, apesar de se tratar de uma microalga vermelha, *P. purpureum* também possui clorofilas (Kavitha *et al.*, 2016).

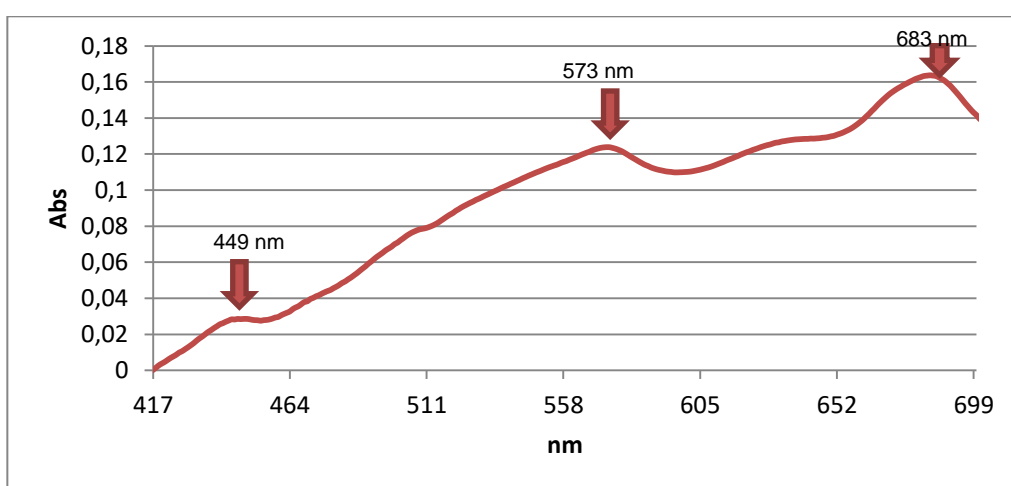


Figura 3.4 - Gráfico ilustrativo do espectro de absorção da cultura de *P. purpureum* no dia 0 de cultura. Abs – absorvância medida; nm – comprimento de onda.

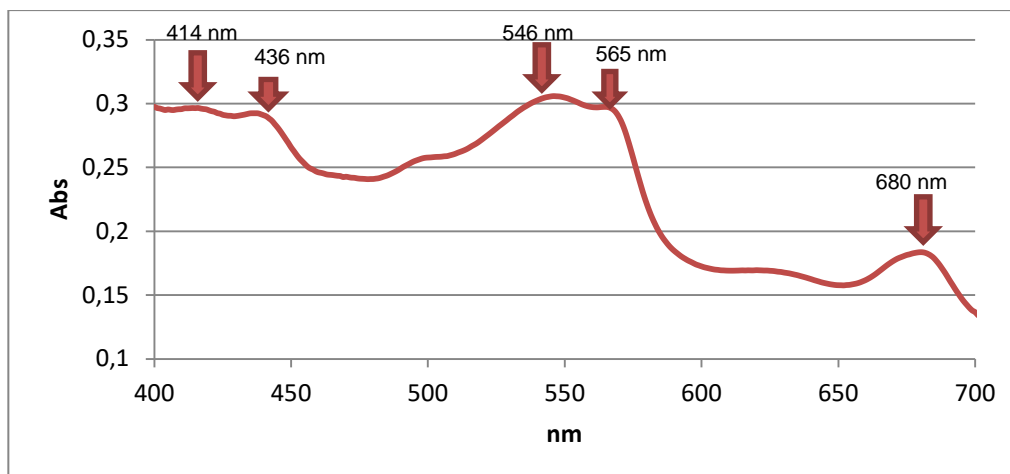


Figura 3.5 - Gráfico ilustrativo do espectro de absorção da cultura de *P. purpureum* no dia 35 de cultura. Abs – absorvância medida; nm – comprimento de onda.

O gráfico do espectro de absorção de *P. purpureum*, presente na **Figura 3.5**, corresponde a um estado avançado de crescimento, e mostra-se com valores mais elevados de absorvância, significando que existe uma maior concentração de biomassa. Neste gráfico é possível notar alguns picos, ainda que ligeiros, em vários valores de absorvância, como nos valores 414 e 436 nm, encontrando-se o primeiro valor dentro do espectro de absorção dos carotenóides e o segundo pode relacionar-se com as clorofilas presentes na microalga, nomeadamente a clorofila a (Lichtenthaler e Buschmann, 2005). Podem considerar-se outros dois picos de absorção entre os 500 e os 600 nm, mais propriamente nos 546 nm e nos 565 nm, estando dentro do espectro de absorção das ficobiliproteínas, nomeadamente a ficoeritrina (540-570 nm) (Román *et al.*, 2002). É, ainda, possível considerar um último pico de absorção, neste caso nos 680 nm, podendo, novamente, relacionar-se com o pico de absorção da clorofila a (Glow, n.d.).

A caracterização da biomassa das duas espécies em estudo, pela análise de elementos minerais, através do método de espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF), permitiu o conhecimento da sua riqueza mineral no que toca a alguns elementos, como macroelementos, microelementos e contaminantes químicos inorgânicos.

Tabela 3.3 - Valores médios \pm DP da quantificação de elementos minerais, pelo método XRF, das duas espécies de microalgas; os elementos minerais encontram-se em mg/100g de matéria húmida; Ca – cálcio; K – potássio; P – fósforo; Cl – cloro; S – enxofre; Mg – magnésio; Si – silício; Fe – ferro; Se – selénio; Zn – zinco; Cu – cobre; Cr – crómio; Ni – níquel; As – arsénio; Cd – cádmio; Pb – chumbo; Sn - estanho; Al – alumínio.

Macroelementos							
	Ca	K	P	Cl	S	Mg	
<i>C. vulgaris</i>	153.9±1.6	510.0±12.0	470.8±3.0	670.4±2.7	451.9±0.5	<107.2±24.0	
<i>P. purpureum</i>	1839.6±5.1	1867.2±12.2	455.1±1.7	1985.8±2.2	735.8±1.8	<199.8±28.5	
Microelementos							
	Si	Fe	Se	Zn	Cu	Cr	Ni
<i>C. vulgaris</i>	998.9±2.6	<14.8±0.1	<1.5±0.0	<1.6±0.0	<4.4±0.0	<8.08±0.1	<8.7±0.1
<i>P. purpureum</i>	3034.01±1.6	<23.2±0.3	<1.5±0.0	<3.8±0.0	<9.4±0.1	<15.3±0.0	<15.4±0.1
Contaminantes químicos inorgânicos							
	As	Cd	Pb	Sn	Al		
<i>C. vulgaris</i>	<1.5±0.0	<2.1±0.0	<1.5±0.0	<3.4±0.0	<20.3±0.4		
<i>P. purpureum</i>	<1.5±0.0	<3.5±0.1	<1.5±0.0	<7.2±1.3	<52.4±0.2		

Através do estudo dos resultados apresentados na **Tabela 3.3**, é possível concluir que a espécie *Porphyridium purpureum* possui uma riqueza mineral superior a *Chlorella vulgaris*, tanto em macroelementos como em microelementos, à exceção do fósforo, que foi ligeiramente inferior. Comparando os resultados obtidos com os presentes na literatura, os valores de *C. vulgaris* encontram-se abaixo dos valores reportados por Tokusoglu e Unal (2003), que apresenta valores para os elementos cálcio, potássio e fósforo. Também os resultados da análise de *P. purpureum* se encontram diferentes dos presentes na literatura, apresentando-se superiores aos reportados por Kavitha *et al.* (2016), ainda que apenas exiba valores para os elementos cálcio e potássio. Esta discrepância nos resultados deve-se ao estado da matéria aquando da análise, uma vez que os valores apresentados na **Tabela 3.3** correspondem aos elementos minerais presentes em matéria húmida e, os resultados presentes na literatura são referentes a análises feitas a matéria seca/liofilizada (Kavitha *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003). Também é de considerar a possível existência de diferenças devido à utilização de diferentes técnicas para quantificação dos elementos minerais, bem como diferentes meios de culturas para microalgas, ou diferentes condições do ambiente de crescimento. Pode, ainda, pôr-se a hipótese de existirem vestígios de meio de cultura no concentrado de biomassa analisado, ainda que tenha sido submetido a várias lavagens, o que pode influenciar os resultados. No que toca à presença de elementos minerais considerados contaminantes, enunciados na referida tabela, esta não deve ser considerada, uma vez que não foram detetados, situando-se abaixo do valor de deteção do equipamento, ou as concentrações detetadas são desprezáveis. À semelhança destes elementos, outros como o magnésio e todos os microelementos, à exceção do silício, apresentam-se com um valor infe-

rior ao limite de detecção. Isto pode relacionar-se com o facto de a análise ter sido realizada com matéria húmida, o que permite uma maior dispersão dos elementos. Seria enriquecedor realizar esta análise com matéria seca/lioofilizada, tornando possível uma correta comparação com os dados descritos na literatura científica.

Relativamente à análise do teor de sólidos totais e minerais feita ao concentrado de biomassa, isto é, anterior à liofilização, os resultados apresentam-se na seguinte tabela, calculados através das equações descritas no ponto **c)** da secção **2.1.3**.

Tabela 3.4 - Valores médios \pm DP obtidos na análise do teor de sólidos totais e de minerais da biomassa concentrada recolhida das culturas de microalgas antes do processo de liofilização; os resultados apresentam-se em percentagem (%).

	Peso seco (%)	Cinzas (%)	Humidade (%)	Peso seco livre de cinzas (%)
<i>C. vulgaris</i>	7.0 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0	93.0 \pm 0.0	6.2 \pm 0.0
<i>P. purpureum</i>	2.4 \pm 0.0	6.2 \pm 0.1	97.6 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0

Em primeiro lugar, é de notar que, por motivos de escassez de biomassa, os volumes de biomassa das duas espécies utilizados não foram iguais, tal como descrito anteriormente, no ponto **c)** da secção **2.1.3**. Na execução desta análise, o volume de biomassa concentrada de *P. purpureum* (5 mL) foi o dobro, relativamente ao volume de biomassa de *C. vulgaris* utilizado (2.5 mL), dado que a quantidade de biomassa de *C. vulgaris* era inferior. Uma vez que, neste processo, foi utilizado um concentrado de biomassa, era esperado que o teor de humidade fosse bastante elevado, tal como se pode observar na **Tabela 3.4**, correspondendo a 93.03% e 97.58% para *C. vulgaris* e *P. purpureum*, respetivamente. Através da análise dos resultados, é possível concluir que o teor de cinzas, isto é, de minerais, é superior na segunda espécie, assim como se mostrou nos resultados da análise de elementos minerais, apesar de tal não ser suportado pela literatura existente (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; Bernaerts *et al.*, 2018; de Moraes *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2016; Fuentes *et al.*, 2000; Kavitha *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003). Esta diferença de resultados, relativamente ao teor de minerais, pode dever-se à utilização de diferentes meios de culturas para microalgas, diferentes condições do ambiente de crescimento ou à existência de vestígios de meio de cultura no concentrado de biomassa analisado, ainda que tenha sido submetido a várias lavagens. Relativamente à quantidade de biomassa microalgal adicionada às formulações de gelado, após este processo foi possível conhecer o peso seco que compõe os produtos criados, sendo 0.3 g na formulação C1, 0.6 g na formulação P1, 0.6 g na formulação C2, e 1.2 g na formulação P2.

Após liofilização, como era esperado, houve alterações nos resultados da análise feita, expostos na **Tabela 3.5**. Tal como ocorreu na análise anterior, por motivos de escassez de biomassa, esta foi utilizada em diferentes quantidades para as duas microalgas, sendo 100 mg para *C. vulgaris* e 30 mg para *P. purpureum*.

Tabela 3.5 - Valores médios \pm DP obtidos na análise do teor de sólidos totais e de minerais da biomassa concentrada e recolhida das culturas de microalgas após o processo de liofilização; os resultados apresentam-se em percentagem (%).

	Peso seco (%)	Cinzas (%)	Humidade (%)	Peso seco livre de cinzas (%)
<i>C. vulgaris</i>	91.2 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	8.8 \pm 0.2	75.0 \pm 0.3
<i>P. purpureum</i>	85.5 \pm 0.4	0.9 \pm 0.0	14.5 \pm 0.4	56.2 \pm 0.1

Tal como esperado, após o processo de liofilização, o teor de humidade diminuiu substancialmente nas duas espécies. Contrariamente aos resultados obtidos anteriormente, nomeadamente na quantificação de elementos minerais, pelo método XRF, o teor de minerais (cinzas) é superior em *C. vulgaris*, estando de acordo com a literatura estudada (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; Bernaerts *et al.*, 2018; de Moraes *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2016; Fuentes *et al.*, 2000; Kavitha *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003). Esta diferença pode residir no facto de, desta vez, a análise ter sido feita a biomassa seca, tal como presente na literatura, contrariamente ao ocorrido utilizando o método XRF. O processo de liofilização poderá, também, ter eliminado vestígios de meio de cultura que estariam a influenciar os resultados, quando comparados com os resultados da análise anterior ao processo. Ainda de acordo com a literatura apresentada, os teores de minerais de ambas as espécies apresentam-se muito inferiores, podendo esta discrepância estar relacionada com utilização de diferentes meios de culturas, diferentes parâmetro de crescimento, ou devido à quantidade de biomassa utilizada durante o procedimento, uma vez que, devido à escassez desta, pode ter promovido erros de análise.

Relativamente ao teor em açúcares, o resultado da análise a *C. vulgaris* revelou-se semelhante ao sustentado na evidência científica (20% de hidratos de carbono), ainda que ligeiramente superior (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; de Moraes *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003), apresentando cerca de 26% de teor de açúcares, como se pode observar na **Tabela 3.6**. No caso de *P. purpureum*, o seu teor em açúcares mostra-se dentro do intervalo de valores ditado pela literatura (13-30% de hidratos de carbono).

Tabela 3.6 - Valores médios \pm DP obtidos na análise do teor em açúcares, proteínas e lípidos totais, da biomassa liofilizada das duas espécies de microalgas em estudo; os resultados apresentam-se em percentagem (%).

	<i>C. vulgaris</i>	<i>P. purpureum</i>
Açúcares totais	25.7 \pm 1.1	19.0 \pm 0.3
Proteínas totais	31.6 \pm 1.4	16.3 \pm 1.2
Lípidos totais	11.5 \pm 0.3	4.1 \pm 0.7

Estes resultados, correspondentes a matéria seca, podem levar à conclusão que o meio de cultura, bem como as condições ambientais fornecidas às culturas, corresponderam às necessidades destas, levando a um crescimento e produção normal de açúcares totais.

Em relação ao teor em proteínas totais, expostos na **Tabela 3.6**, tal como esperado, é superior para a *C. vulgaris*, estando de acordo com a literatura (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013;

Bernaerts *et al.*, 2018; de Moraes *et al.*, 2015; Fuentes *et al.*, 2000; Kavitha *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003). O resultado de 16% em proteína para a *P. purpureum* está de acordo com os 15-36% da literatura, já a *C. vulgaris* (32%) apresenta valores ligeiramente inferiores, mas com uma diferença desprezável, quando comparando com 38-40% da literatura científica.

Ainda discutindo os resultados expostos na **Tabela 3.6**, pode observar-se que o teor em lípidos totais de *C. vulgaris* é superior, tal como sustentado pela evidência científica na área (Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2013; Bernaerts *et al.*, 2018; de Moraes *et al.*, 2015; Fuentes *et al.*, 2000; Kavitha *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2016; Tokusoglu e Unal, 2003). Os valores obtidos para os lípidos (11% de lípidos totais para *C. vulgaris* e 4% para *P. purpureum*) encontram-se dentro do intervalo de valores presente na literatura estudada (5-40% e 2-8% de lípidos respetivamente).

É de notar que os resultados presentes na referida tabela não correspondem a 100% da composição das microalgas (cerca de 70% para *C. vulgaris* e de 40% para *P. purpureum*), tal como deveria ocorrer, o que pode comprometer a discussão com a literatura científica. Estes resultados podem relacionar-se com a pouca amostra disponível para a realização dos procedimentos, bem como com a falta de tempo para repetir o processo várias vezes, de forma a recolher resultados consistentes.

3.2. GELADO

As seis formulações de gelado produzidas foram analisadas e comparadas entre si, de forma a verificar as diferenças entre as formulações controlo e as formulações contendo biomassa microalgal em diferentes concentrações.

3.2.1. ANÁLISE DA COR DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS

Um dos grandes focos de utilização de microalgas é como corante alimentar, conferindo diferentes e apelativas cores aos produtos, acabando por acrescentar algum valor nutritivo aos mesmos (Batista *et al.*, 2008; Becker, 2004; Fradique *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2007; Gouveia *et al.*, 2006; Raymundo *et al.*, 2005; Sekar e Chandramohan, 2008; Tannin-Spitz *et al.*, 2005).

Após análise colorimétrica da primeira formulação de gelados, isto é, formulações com menor volume de biomassa microalgal, foi possível verificar uma alteração de cor no produto contendo microalgas, tal como verificável na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 - Valores médios \pm DP obtidos na análise colorimétrica às primeiras formulações de gelado; N1 – gelado de nata controlo; C1 - gelado de nata contendo 5 mL de biomassa de *C. vulgaris*; P1 - gelado de nata contendo 10 mL de biomassa de *P. purpureum*; N2 – gelado de nata controlo com redução de 20% de açúcar; C2 - gelado de nata contendo 10 mL de biomassa de *C. vulgaris* e menos 20% de açúcar; P1 - gelado de nata contendo 20 mL de biomassa de *P. purpureum* e menos 20% de açúcar; L* - luminosidade (preto-branco); a* - verde-vermelho; b* - azul-amarelo; C* - saturação; h° - tonalidade; As letras diferentes (a – f) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado parâmetro nas várias formulações de gelado.

	L*	a*	b*	C*	h°
N1	90.2 \pm 1.7 ^a	-1.6 \pm 0.1 ^c	11.4 \pm 0.4 ^a	11.5 \pm 0.4 ^b	98.1 \pm 0.1 ^d
C1	80.1 \pm 1.5 ^b	-7.2 \pm 0.2 ^d	13.1 \pm 0.2 ^a	14.9 \pm 0.2 ^a	118.7 \pm 0.2 ^b
P1	87.2 \pm 0.2 ^a	2.6 \pm 0.1 ^b	7.5 \pm 0.2 ^b	7.9 \pm 0.2 ^c	71.2 \pm 0.5 ^e
N2	84.2 \pm 1.9 ^a	-2.8 \pm 0.4 ^c	12.1 \pm 1.6 ^a	12.4 \pm 1.6 ^b	103.1 \pm 0.1 ^c
C2	67.2 \pm 2.6 ^c	-9.2 \pm 0.4 ^e	13.8 \pm 0.8 ^a	16.6 \pm 0.8 ^a	123.8 \pm 0.5 ^a
P2	65.5 \pm 5.6 ^c	8.2 \pm 0.8 ^a	6.0 \pm 0.7 ^b	10.2 \pm 1.1 ^b	36.1 \pm 0.7 ^f

Analisando os resultados dos diferentes parâmetros da análise colorimétrica, é possível verificar que, no que toca à luminosidade (L*), a maioria das formulações apresenta valores elevados, próximos de 100, o que corresponde a luz branca, de acordo com a aparência das mesmas, sendo este valor mais baixo nas formulações C2 e P2. Relativamente aos valores de tonalidade de cor, a formulação N1 apresenta um valor negativo para a* e um positivo para b*, o que resulta numa variação de cores entre verde e amarelo, respetivamente, sendo amarelo a cor mais proeminente, o que, aliado a uma elevada luminosidade resulta num gelado “amarelo-esbranquiçado”, típico do gelado de nata, como observável na **Figura 3.6-A**. A formulação C1, embora apresentando um valor negativo para a* e um positivo para b*, resultou numa cor verde mais acentuada, como observável na **Figura 3.6-A**, devido à sua menor luminosidade, valor de a* mais negativo, intensificando a cor verde, e valor de b* ligeiramente superior, reforçando a cor amarela. Já a formulação P1, como expectável, apresenta uma coloração diferente, particularmente devido ao seu valor positivo de a*, correspondente à cor vermelha. O seu elevado valor de L* e os seus valores positivos de a* e b* levam esta formulação a deter uma cor clara e entre as cores vermelho e amarelo, resultando numa cor rosa bastante claro, como observável na **Figura 3.6-A**. Debruçando a atenção sobre os últimos parâmetros, saturação (C*) e tonalidade (h°), é observável que as diferentes formulações apresentam valores distintos, em particular no que toca ao parâmetro h°. Relativamente à saturação, ou intensidade da cor, pode-se concluir que esta é relativamente baixa, resultando em cores pouco intensas. A variável h°, tonalidade, sendo um indicador da variação de cor no plano formado pelas coordenadas a* e b*, permite definir concretamente a cor do produto, mostrando que a formulação N1, com h°=98, se encontra muito próxima da cor amarelo; C1, com h°=119, se encontra entre as cores amarelo e verde, mas esverdeado; e P1 encontra-se entre as cores vermelho e amarelo, mais avermelhado (Loskotova, n.d.).

Abordando os resultados presentes na **Tabela 3.7**, à luz do teste ANOVA, entre a formulação controlo e as formulações com biomassa de microalgas, foi possível confirmar estatisticamente a alteração da cor dos gelados, como resultado da presença dos pigmentos que as microalgas possuem (Batista *et al.*, 2008; Becker, 2004; Fradique *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2007; Gouveia *et al.*, 2006;

Raymundo *et al.*, 2005; Sekar e Chandramohan, 2008; Tannin-Spitz *et al.*, 2005). No caso da formulação com *C. vulgaris* (C1), comparando com a formulação N1, foi possível verificar diferenças significativas, com um nível de confiança de 95%, em todos os parâmetros da análise colorimétrica, com exceção do parâmetro b^* . No caso da formulação com *P. purpureum* (P1), verificaram-se diferenças significativas, com uma confiança de 95%, em todos os parâmetros à exceção da luminosidade (L^*).

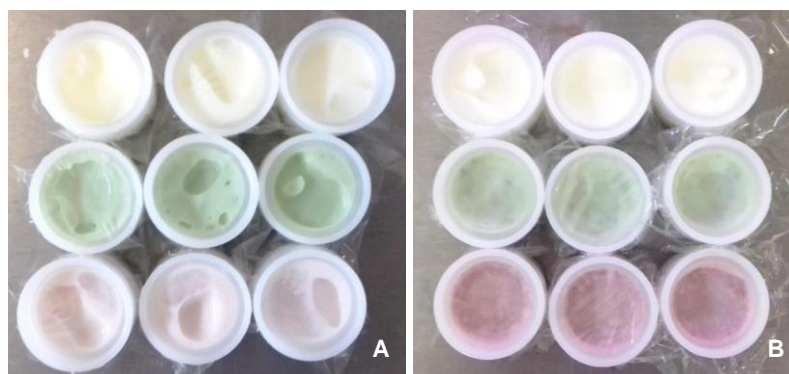


Figura 3.6 - Fotografia da preparação das várias formulações de gelados com incorporação de biomassa microalgal (*C. vulgaris* e *P. purpureum*) para análise colorimétrica; A - primeira formulação (N1, C1 e P1); B - segunda formulação (concentração de biomassa microalgal superior) (N2, C2 e P2).

Comparou-se, também, os parâmetros de cor entre formulações com a adição da mesma microalga, de forma a determinar se o aumento de volume resultou numa influência na cor do gelado, à luz do teste ANOVA. A análise das formulações C1 e C2 resultou em diferenças significativas, com uma confiança de 95%, entre os parâmetros L^* , a^* e h° , traduzindo-se numa diminuição da luminosidade e na intensificação da cor verde, o que demonstra uma relação direta entre a concentração da biomassa microalgal e uma intensificação da cor do gelado. Debruçando a análise sobre as formulações P1 e P2, todos os parâmetros, com exceção de b^* , apresentam diferenças significativas, com uma confiança de 95%, o que resultou num escurecimento do produto e intensificação da cor vermelha, tal como observável na **Figura 3.6**. Tal resultado reforça a ideia de que o aumento de volume de concentrado de biomassa leva a alterações na cor das formulações.

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PRODUZIDAS

Os resultados da análise de elementos minerais das várias formulações de gelado, através do método XRF, mostram (**Tabelas 3.8 e 3.9**) a riqueza mineral dos vários produtos, no que toca a macroelementos e ao microelementos. Numa primeira observação também é notório que o aparelho não detetou contaminantes químicos inorgânicos, sendo a sua presença desprezável.

Tabela 3.8 - Valores médios \pm DP dos minerais, pelo método XRF, das formulações de gelado produzidas (N1 – gelado nata controlo; C1 – gelado de nata com incorporação de 5 mL de biomassa de *C. vulgaris*; P1 – gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *P. purpureum*; os elementos minerais encontram-se em mg/100g de massa húmida. Ca – cálcio; K – potássio; P – fósforo; Cl – cloro; S – enxofre; Mg – magnésio; Si – silício; Fe – ferro; Se – selénio; Zn – zinco; Cu – cobre; Cr – crómio; Ni – níquel; As – arsénio; Cd – cádmio; Pb – chumbo; Sn – estanho; Al – alumínio. As letras diferentes (a –b) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado elemento mineral nas várias formulações de gelado.

Macroelementos							
	Ca	K	P	Cl	S	Mg	
N1	564.9±6.3 ^b	1346.8±2.5 ^a	356.8±3.4 ^a	1123.1±2.4 ^a	473.0±6.9 ^a	<121.4±25.0	
C1	672.8±3.7 ^a	1121.6±9.2 ^a	444.1±7.3 ^a	750.2±7.2 ^a	460.9±1.1 ^a	<97.3±20.0	
P1	962.1±1.8 ^a	1102.4±1.5 ^a	445.2±1.1 ^a	1180.1±5.5 ^a	507.7±6.5 ^a	<142.6±13.2	
Microelementos							
	Si	Fe	Se	Zn	Cu	Cr	Ni
N1	1438.1±4.9 ^a	<15.9±1.2	<1.5±0.0	<2.0±0.3	<5.5±0.7	<10.0±0.7	<10.1±1.2
C1	849.0±1.8 ^a	<14.9±0.2	<1.5±0.0	<1.8±0.0	<4.8±0.1	<9.6±0.5	<9.1±0.3
P1	1479.1±6.9 ^a	<16.5±0.8	<1.5±0.0	<2.2±0.1	<5.8±0.4	<12.2±0.4	<10.7±0.7
Contaminantes químicos inorgânicos							
	As	Cd	Pb	Sn		Al	
N1	<1.5±0.0	<2.5±0.8	<1.5±0.0	<4.0±0.5		<30.2±1.0	
C1	<1.5±0.0	<2.2±0.1	<1.5±0.0	<4.1±0.8		<24.4±1.5	
P1	<1.5±0.0	<2.7±0.2	<1.5±0.0	<5.1±1.0		<37.9±8.7	

Tabela 3.9 - Valores médios \pm DP dos minerais, pelo método XRF, das formulações de gelado produzidas (N2– gelado nata controlo com redução de 20% de açúcar; C2 – gelado de nata com redução de 20% de açúcar e incorporação de 10 mL de biomassa de *C. vulgaris*; P2 - gelado de nata com redução de 20% de açúcar e incorporação de 20 mL de biomassa de *P. purpureum*); os elementos minerais encontram-se em mg/100g de massa húmida. Ca – cálcio; K – potássio; P – fósforo; Cl – cloro; S – enxofre; Mg – magnésio; Si – silício; Fe – ferro; Se – selénio; Zn – zinco; Cu – cobre; Cr – crómio; Ni – níquel; As – arsénio; Cd – cádmio; Pb – chumbo; Sn – estanho; Al – alumínio. As letras diferentes (a – c) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado elemento mineral nas várias formulações de gelado.

Macroelementos							
	Ca	K	P	Cl	S	Mg	
N2	558.7±1.8 ^c	1031.1±1.8 ^b	238.8±4.8 ^b	637.7±5.3 ^b	327.7±4.9 ^b	<101.8±11.5	
C2	772.4±4.5 ^b	1280.1±4.2 ^b	463.7±3.3 ^b	1006.0±4.4 ^b	512.6±1.9 ^b	<157.7±25.7	
P2	1166.1±3.9 ^a	2130.6±1.9 ^a	1181.0±2.1 ^a	1666.1±2.6 ^a	1035.5±1.2 ^a	<160.4±2.5	
Microelementos							
	Si	Fe	Se	Zn	Cu	Cr	Ni
N2	760.2±8.3 ^c	<14.8±0.4	<1.5±0.0	<1.8±0.1	<4.8±0.2	<9.6±0.6	<9.2±0.3
C2	1225.4±8.3 ^b	<19.2±1.9	<1.5±0.0	<2.7±0.4	<7.0±1.0	<10.9±0.8	<12.8±1.6
P2	1776.4±6.3 ^a	<20.2±0.2	<1.5±0.0	<2.9±0.1	<7.6±0.1	<11.2±0.2	<13.8±0.3
Contaminantes químicos inorgânicos							
	As	Cd	Pb	Sn	Al		
N2	<1.5±0.0	<2.3±1.3	<1.5±0.0	<3.7±0.1	<34.3±3.3		
C2	<1.5±0.0	<3.1±0.3	<1.5±0.0	<8.4±0.6	<51.5±7.9		
P2	<1.5±0.0	<3.2±0.0	<1.5±0.0	<7.7±0.1	<54.5±1.3		

É evidente a diferença entre as várias formulações, quando observando as duas tabelas (**Tabelas 3.8 e 3.9**), verificando-se um aumento da concentração da maioria dos elementos minerais nas formulações com microalgas, e nos gelados com maior concentração de biomassa, com exceção dos minerais potássio e silício.

Realizou-se o teste ANOVA, comparando gelados controlo (sem biomassa microalgal) com aqueles aos quais foi incorporada biomassa, bem como aqueles que tinham diferentes concentrações. Foi ainda avaliada a diferença entre o enriquecimento causada pela microalga *C. vulgaris* e pela *P. purpureum*. Relativamente ao teste efetuado para as primeiras formulações (N1, C1 e P1) o mesmo resultou em diferenças significativas, com um nível de confiança de 95%, apenas para o elemento Ca (cálcio), mostrando que a formulação controlo (N1) possui significativamente menos cálcio do que as formulações que incorporam biomassa de microalgas, não existindo alterações substanciais para os outros elementos minerais. Também não foram demonstradas diferenças significativas entre os teores minerais dos dois gelados contendo biomassa microalgal (C1 e P1).

Tendo em conta os resultados obtidos para estas três primeiras formulações, à luz do regulamento (EU) nº 1924/2006 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2007) e do regulamento (EU) nº 1169/2011 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011), é possível alegar que estas possuem um alto teor em minerais (>30% VRN), como demonstrado na **Tabela 3.10**. Relativa-

mente a este aspeto, é necessário ter em conta que estes valores recomendados de nutrientes são referentes a pessoas saudáveis, adultas, sem diferenciação de género biológico e com um peso entre 65 Kg e 70 Kg, e que a indústria não controla a quantidade de produto alimentar que o cliente consome. Aliado a este facto, existe toda a dieta diária que fornece os nutrientes e minerais necessários, o que pode fazer com que uma elevada quantidade de um produto como o que foi criado neste trabalho possa não ser benéfico numa grande porção, uma vez que as concentrações de minerais, em algumas formulações, ultrapassam os 100% do valor diário recomendado.

Tabela 3.10 - Valores de referência do nutriente, em percentagem, para os minerais cálcio, potássio, fósforo e cloro, presentes em 100 g de gelado das formulações concebidas (N1,2 – gelado nata controlo; C1,2 – gelado de nata com incorporação de biomassa de *C. vulgaris*; C1 – 5 mL de biomassa/C2 – 10 mL de biomassa; P1,2 - gelado de nata com incorporação de biomassa de *P. purpureum*; P1 – 10 mL de biomassa/P2 – 20 mL de biomassa).

	Ca (%VRN)	K (%VRN)	P (%VRN)	Cl (%VRN)
N1	70.6	67.3	51.0	140.0
C1	84.1	56.1	63.4	93.8
P1	120.3	55.1	63.6	147.5
N2	69.8	51.6	34.1	79.7
C2	96.5	64.0	66.2	125.8
P2	145.8	106.5	168.7	208.3

Como conclusão pode-se inferir que houve enriquecimento do produto, em elementos minerais, através da adição de concentrado de biomassa microalgal.

Passando para as segundas formulações, isto é, formulações onde a quantidade de açúcar foi reduzida em 20% e os volumes de biomassa adicionada foram duplicados, presentes na **Tabela 3.9**, obteve-se, com um nível de confiança de 95% ($p \leq 0.05$), diferenças significativas para todos os elementos minerais detetados pelo aparelho (Ca, K, P, Cl, S, Si), mostrando uma clara superioridade por parte da formulação P2, possuindo um teor mineral significativamente superior às formulações N2 e C2. Também foram detetadas diferenças significativas, com uma confiança de 95%, para os elementos Ca e Si mas, neste caso, mostrando que a formulação N2 possui um teor significativamente inferior destes minerais, comparativamente com as formulações C2 e P2. Deste modo, é possível verificar que houve enriquecimento das formulações de gelado contendo biomassa proveniente de microalgas, comparando com a formulação controlo, e que a formulação contendo *P. purpureum*, ofereceu um maior enriquecimento, tendo também em conta que foi adicionada em maior quantidade aos gelados. Ao contrário do ocorrido quando analisadas as duas primeiras formulações contendo microalgas (C1 e P1) pelo teste ANOVA, as formulações C2 e P2 revelaram diferenças significativas, com uma confiança de 95%, para todos os elementos minerais detetados pelo aparelho, o que se traduz num enriquecimento superior no gelado que incorpora biomassa de *P. purpureum*.

Analisando os resultados presentes na **Tabela 3.10**, com auxílio do regulamento (EU) nº 1924/2006 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2007) e do regulamento (EU) nº

1169/2011(Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011), é possível alegar que estas três formulações possuem um alto teor em minerais (>30% VRN).

Mais uma vez, através desta informação, é possível verificar que a formulação possuidora de concentrado de biomassa de *Porphyridium purpureum* encontra-se mais enriquecida em elementos minerais. Tal era esperado uma vez que o volume adicionado de concentrado de biomassa desta microalga foi superior ao de *C. vulgaris*, e, como a biomassa foi incorporada concentrada húmida, e não liofilizada, não se pode descartar a hipótese de haver interferência de vestígios de meio de cultura, ainda que a biomassa tenha sido submetida a várias lavagens.

À semelhança destes elementos, outros como o magnésio e todos os microelementos, à exceção do silício, apresentam-se com um valor inferior ao erro de deteção, dado que não foram detetados pelo equipamento. Isto pode relacionar-se com o facto de a análise ter sido realizada com matéria húmida, uma vez que não se secou/liofilizou o gelado por escassez de amostra para outras análises e prova hedónica. Apesar deste facto, através dos valores de erro de alguns elementos, como magnésio e ferro, particularmente o magnésio visto que apresenta um elevado valor, pode pôr-se a hipótese de que estas formulações possuem o potencial de serem ricas nestes elementos, visto que, segundo o regulamento (EU) nº 1924/2006, os valores destes elementos nas seis formulações se encontram acima dos 30% do valor recomendado do nutriente (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2007), considerando o valor do erro de deteção. Esta hipótese poderia ser comprovada com uma quantificação de elementos minerais em matéria seca.

Os resultados relativos aos macronutrientes, presentes na **Tabela 3.11**, mostram a ausência de diferenças acentuadas entre as várias formulações, nos vários macroconstituintes estudados.

Tabela 3.11 - Valores médios \pm DP obtidos das análises aos macroconstituintes das várias formulações de gelado (N1,2 – gelado nata controlo; N2 – gelado de nata controlo com redução de 20% de açúcar C1,2 – gelado de nata com incorporação de biomassa de *C. vulgaris*; C1 – 5 mL de biomassa/C2 – 10 mL de biomassa e redução de 20% de açúcar; P1,2 - gelado de nata com incorporação de biomassa de *P. purpureum*; P1 – 10 mL de biomassa/P2 – 20 mL de biomassa e redução de 20% de açúcar); os resultados encontram-se em g/100 mL e VRN em percentagem (%). As letras diferentes (a – b) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado macronutriente na formulação de gelados 1, (r-s) para o mesmo efeito na formulação de gelados 2.

	Açúcares (sacarose)	VRN	Proteínas	VRN	Lípidos	VRN
N1	29.8 \pm 0.9 ^d	33.1	1.4 \pm 0.0	2.7	6.7 \pm 0.5	9.6
C1	30.9 \pm 0.8 ^b	34.3	1.3 \pm 0.0	2.4	4.1 \pm 0.6	5.8
P1	32.2 \pm 0.7 ^a	35.8	1.2 \pm 0.1	2.5	4.4 \pm 0.2	6.2
N2	28.4 \pm 0.1 ^r	32.7	1.3 \pm 0.0	2.5	6.1 \pm 0.1	8.7
C2	30.3 \pm 0.5 ^r	33.7	1.4 \pm 0.0	2.9	4.8 \pm 0.8	6.8
P2	27.8 \pm 0.9 ^r	31.6	1.3 \pm 0.0	2.5	6.0 \pm 0.8	8.6

Comparando os resultados das análises com rótulos de marcas presentes no mercado, é possível afirmar que alguns se encontram muito próximos, uma vez que, por 100 g, um gelado de nata *Carte D'Or* (Olá, Unilever) contém 4.2 g de lípidos e 1.4 g de proteína (Unilever, n.d.), enquanto outros não

correspondem ao esperado, uma vez que o mesmo exemplo possui 11 g de hidratos de carbono dos quais açúcares (Unilever, n.d.). Os valores de açúcares obtidos são muito superiores aos presentes no rótulo, mesmo apresentando uma redução de 20% nas segundas formulações, o que significa que a receita utilizada neste trabalho possui uma quantidade de açúcar muito superior. No que toca aos valores de proteína, estes encontram-se muito semelhantes aos observáveis no rótulo, bem como os valores médios de lípidos, ainda que os mais elevados sejam superiores aos presentes no mercado em 2 g.

Com auxílio do regulamento (EU) nº 1169/2011 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011), foi possível determinar os valores de referência dos nutrientes que se encontram, também, na **Tabela 3.11**.

Recorrendo ao teste ANOVA, compararam-se resultados entre formulações e tentou-se verificar a existência de diferenças significativas nos mesmos. Nas primeiras formulações, não se verificaram diferenças significativas, com uma confiança de 95% ($p \leq 0.05$) entre as formulações N1 e C1, o que significa que a adição de microalgas não teve influência significativa no teor de açúcar do gelado, apesar do ligeiro aumento (**Tabela 3.11**), contrariamente ao resultado do teste entre as amostras N1 e P1, para o qual se obteve diferenças significativas, com uma confiança de 95%, mostrando que a adição de biomassa de *P. purpureum* influenciou o aumento do teor de açúcar da formulação. Nas segundas formulações, não se verificaram diferenças significativas, para o nível de confiança de 95% ($p \leq 0.05$) entre as formulações N2, C2 e P2, ilustrando que a adição de biomassa proveniente de microalgas não teve impacto significativo no teor de açúcar desta receita. Uma vez que as formulações 1 e 2 possuem uma base de gelado diferente, devido à alteração da quantidade de açúcar, não é correto determinar diferenças estatísticas e, por isso, estas formulações não foram comparadas à luz do teste ANOVA.

Em relação ao teor proteico obtido nos gelados, uma vez que a quantificação foi realizada apenas em duplicado, e não em triplicado, não é correto aplicar análise estatística aos resultados. Apesar deste facto, é possível observar que os valores de proteína (**Tabela 3.11**) das formulações contendo microalgas são ligeiramente inferiores à formulação controlo em questão, não sendo o resultado esperado, visto que se desejava um aumento do valor de proteínas totais, o que pode significar que a quantidade de biomassa incorporada não foi suficiente para resultar em diferenças significativas.

Da análise ao teor de lípidos (**Tabela 3.11**), é aparente que as formulações contendo biomassa possuem um menor conteúdo lipídico que as formulações controlo. Este resultado não era esperado e seria interessante investigar-se o porquê desta diminuição lipídica no produto final, podendo tratar-se de um fenómeno benéfico para o consumidor, ou da degradação de qualquer composto que possa contaminar o gelado. À semelhança da quantificação do teor em proteínas totais, a quantificação do teor em lípidos também foi realizada em duplicado, pelo que não se apresenta análise estatística destes dados.

A realização destas análises permitiu, com auxílio da “Tabela da Composição de Alimentos” (Porto e Oliveira, 2007) e do regulamento (EU) nº 1169/2011 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011), a criação de um exemplo de rótulo deste produto, como mostra a **Figura 3.7**, onde estão esquematizados seis rótulos, um para cada formulação. Apesar de os rótulos conterem infor-

mação acerca dos lípidos e lípidos saturados, e hidratos de carbono e açúcares simples, uma vez que apenas foi feita a determinação de lípidos e açúcares totais, são esses valores que constam nos exemplos de rótulo. Seria interessante, e enriquecedor para o trabalho, poder analisar cada um dos componentes especificamente, de modo a oferecer ao consumidor toda a informação nutricional do gelado.

FORMULAÇÃO N1			FORMULAÇÃO N2		
Valores Nutricionais Médios	Por 100 g	% VRN	Valores Nutricionais Médios	Por 100 g	% VRN
Energia	757.2 kJ 181.0 kcal	9.1	Energia	710.0 kJ 169.7 kcal	8.5
Lípidos Totais (g)	6.7	9.6	Lípidos Totais (g)	6.1	8.7
Proteína Total (g)	1.4	2.7	Proteína Total (g)	1.3	2.5
Açúcares Totais (g)	29.8	33.1	Açúcares Totais (g)	28.4	32.7
Cálcio (mg)	564.9	70.6	Cálcio (mg)	558.7	69.8
Potássio (mg)	1346.8	67.3	Potássio (mg)	1031.1	51.6
Fósforo (mg)	356.8	51.0	Fósforo (mg)	238.8	34.1
Cloro (mg)	1123.1	140.0	Cloro (mg)	637.7	79.7

FORMULAÇÃO C1			FORMULAÇÃO C2		
Valores Nutricionais Médios	Por 100 g	% VRN	Valores Nutricionais Médios	Por 100 g	% VRN
Energia	673.9 kJ 161.1 kcal	8.1	Energia	693.5 kJ 165.8 kcal	8.3
Lípidos Totais (g)	4.1	5.8	Lípidos Totais (g)	4.8	6.8
Proteína Total (g)	1.3	2.4	Proteína Total (g)	1.4	2.9
Açúcares Totais (g)	30.9	34.3	Açúcares Totais (g)	30.3	33.7
Cálcio (mg)	672.8	84.1	Cálcio (mg)	772.4	96.5
Potássio (mg)	1121.6	56.1	Potássio (mg)	1280.1	64.0
Fósforo (mg)	444.1	63.4	Fósforo (mg)	463.7	66.2
Cloro (mg)	750.2	93.8	Cloro (mg)	1666.1	125.8

FORMULAÇÃO P1			FORMULAÇÃO P2		
Valores Nutricionais Médios	Por 100 g	% VRN	Valores Nutricionais Médios	Por 100 g	% VRN
Energia	702.9 kJ 168.0 kcal	8.4	Energia	696.8 kJ 166.5 kcal	8.3
Lípidos Totais (g)	4.4	6.2	Lípidos Totais (g)	6.0	8.6
Proteína Total (g)	1.2	2.5	Proteína Total (g)	1.3	2.5
Açúcares Totais (g)	32.2	35.8	Açúcares Totais (g)	27.8	31.6
Cálcio (mg)	962.1	120.3	Cálcio (mg)	1166.1	145.8
Potássio (mg)	1102.4	55.1	Potássio (mg)	2130.6	106.5
Fósforo (mg)	445.2	63.6	Fósforo (mg)	1181.0	168.7
Cloro (mg)	1180.1	147.5	Cloro (mg)	1666.1	208.3

Figura 3.7 – Exemplos de possíveis rótulos para os gelados concebidos (N1,2 – gelado nata controlo; N2 – gelado de nata controlo com redução de 20% de açúcar; C1,2 – gelado de nata com incorporação de biomassa de *C. vulgaris*; C1 – 5 mL de biomassa/C2 – 10 mL de biomassa e redução de 20% de açúcar; P1,2 - gelado de nata com incorporação de biomassa de *P. purpureum*; P1 – 10 mL de biomassa/P2 – 20 mL de biomassa e redução de 20% de açúcar).

3.2.3. ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA

Tal como exposto na secção 2.2.5. de **METODOLOGIA**, foram realizadas duas provas hedónicas, em tempos diferentes do trabalho, para avaliação das formulações desenvolvidas. O objetivo foi aferir a aceitabilidade, por parte dos consumidores, bem como obter uma avaliação de determinados atributos das várias formulações para desenvolver um perfil sensorial dos gelados concebidos.

Abordando os resultados da primeira prova, esta realizou-se recorrendo a uma amostra de 43 indivíduos, de ambos os sexos. Relativamente à avaliação dos atributos do produto alimentar, esta está exposta na **Tabela 3.12**, recorrendo aos valores médios dos resultados.

Tabela 3.12 - Valores médios \pm DP dos resultados da análise sensorial hedónica às primeiras formulações de gelado concebidas (N1 – gelado de nata controlo; C1 – gelado de nata com incorporação de 5 mL de biomassa de *C. vulgaris*; P1 – gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *P. purpureum*); avaliação dos atributos dos gelados confeccionados; As letras diferentes (a – b) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado atributo avaliado na análise sensorial da formulação de gelados.

	Aspetto	Cor	Cheiro	Textura	Sabor	Apreciação Global
N1	7.5 \pm 1.0 ^a	7.6 \pm 1.3 ^a	6.8 \pm 1.5 ^a	7.5 \pm 1.2 ^a	7.7 \pm 1.3 ^a	7.5 \pm 1.1 ^a
C1	7.5 \pm 1.1 ^a	7.6 \pm 1.3 ^a	6.5 \pm 1.4 ^a	7.7 \pm 1.1 ^a	7.4 \pm 1.4 ^a	7.5 \pm 1.1 ^a
P1	7.4 \pm 1.0 ^a	7.7 \pm 1.1 ^a	6.8 \pm 1.4 ^a	7.2 \pm 1.3 ^a	7.9 \pm 1.1 ^a	7.7 \pm 1.1 ^a

Analisando os dados da tabela, é possível verificar que estes variam entre 7 e 8, o que, como observável na ficha de prova no **Anexo 2**, correspondem a “Gosto moderadamente” e “Gosto muito”, sendo a variável “cheiro” a que obteve uma menor pontuação. É de notar que a formulação controlo obteve uma boa avaliação global, e também em cada atributo individualmente, mostrando tratar-se de uma boa receita base para o desenvolvimento deste género de produtos. Também é possível verificar que a formulação com apreciação global mais elevada é a formulação P1, o que pode revelar que a adição da microalga *P. purpureum* teve um impacto positivo no produto. Após aplicação do teste ANOVA aos vários atributos, comparando a formulação controlo com as formulações contendo biomassa proveniente de microalgas, não foram verificadas diferenças significativas, com uma confiança de 95% ($p \leq 0.05$). Este resultado indica que qualquer mudança que tenha ocorrido nos atributos, não foi estatisticamente relevante, e mostra que, apesar de receberem uma boa aceitação, os consumidores não preferem, nem rejeitam, os gelados que incorporam biomassa microalgal, apesar dos seus potenciais benefícios para a saúde.

Esta avaliação dos atributos dos produtos alimentares desenvolvidos permitiu criar um perfil sensorial para cada uma das formulações, que se encontra na **Figura 3.8-A** e na **Figura 6.2** do **Anexo 3**, onde é possível verificar que este é muito semelhante para as três formulações.

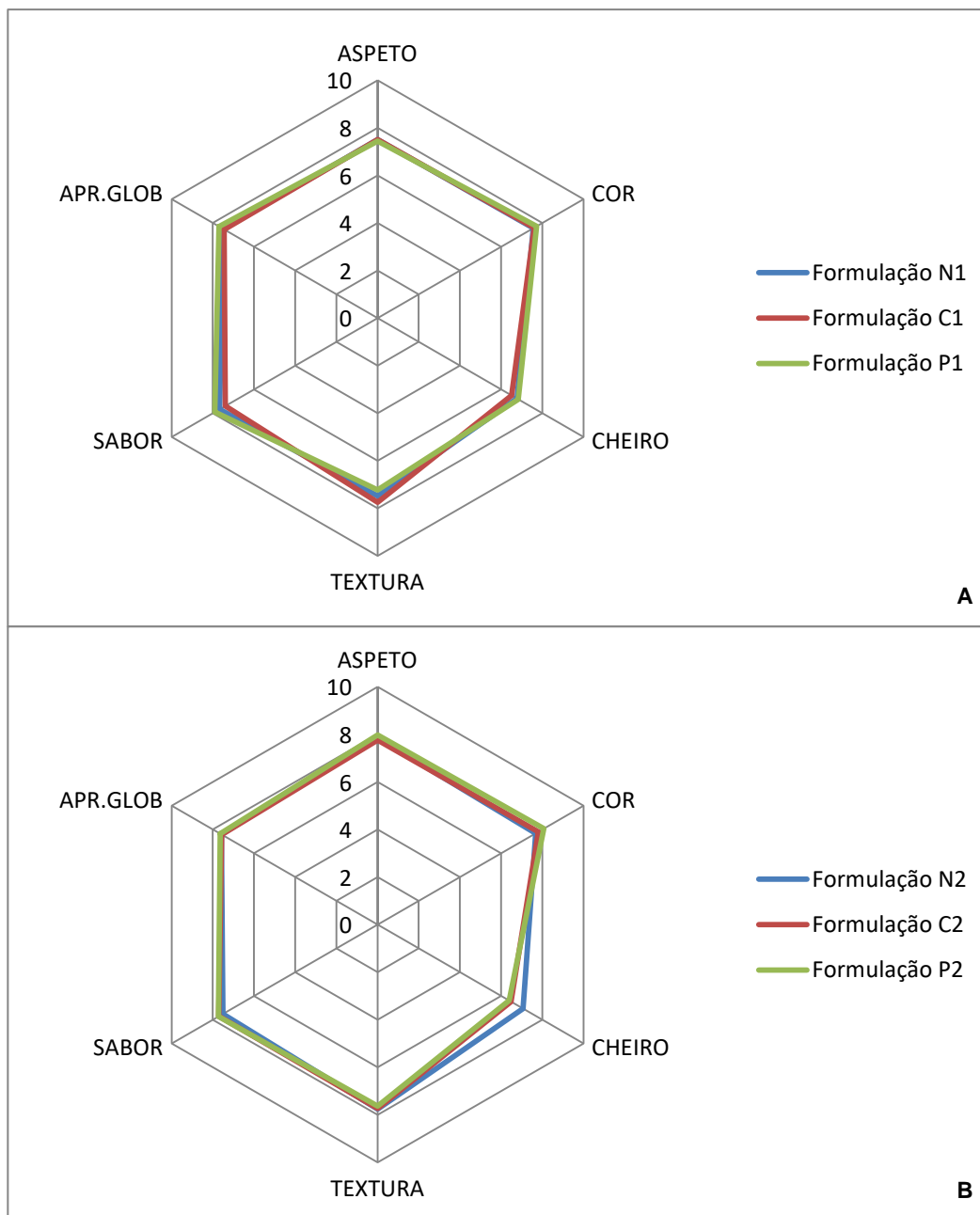


Figura 3.8 - Gráficos ilustrativos do perfil sensorial de cada formulação desenvolvida agrupados para comparação (A: N1 – gelado nata controlo; C1 – gelado de nata com incorporação de 5 mL de biomassa de *C. vulgaris*; P1 - gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *P. purpureum*; B: N2 – gelado nata controlo com redução de 20% de açúcar; C2 – gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *C. vulgaris* e redução de 20% de açúcar; P2 - gelado de nata com incorporação de 20 mL de biomassa de *P. purpureum* e redução de 20% de açúcar).

Abordando a intenção de compra destes produtos, esta foi avaliada na prova, tendo em conta a aceitabilidade do produto, e os resultados encontram-se na **Tabela 3.13**

Tabela 3.13 - Valores médios \pm DP dos resultados da intenção de compra das primeiras formulações de gelado concebidas (N1 – gelado de nata controlo; C1 – gelado de nata com incorporação de 5 mL de biomassa de *C. vulgaris*; P1 – gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *P. purpureum*); As letras diferentes (a – b) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisada a intenção de compra da formulação de gelados

N1	C1	P1
3.2 \pm 0.7 ^a	3.1 \pm 0.9 ^a	3.2 \pm 0.6 ^a

Através da análise desta tabela, verifica-se que os três resultados correspondem ao nível de avaliação 3, isto é, “Provavelmente compraria”, sendo um bom resultado para um novo produto deste género, contendo biomassa proveniente de microalgas. O resultado do teste ANOVA, onde se compararam os resultados da intenção de compra das três formulações, não revelou diferenças significativas, com um nível de confiança de 95% ($p \leq 0.05$), o que demonstra que, comparativamente a um gelado de nata, a inclusão de biomassa microalgal não tem um impacto estatisticamente relevante na intenção de compra por parte desta amostra de consumidores, mesmo sendo desejável que fosse superior.

Por forma a melhor entender os resultados desta análise sensorial hedónica, foram realizadas associações estatísticas da influência do sexo e idade na apreciação global e intenção de compra, bem como a influência da apreciação global na intenção de compra, com recurso ao *software* EZR ®. Estas associações revelaram que não há evidência de associação, com uma confiança de 95% ($p \leq 0.05$), entre as variáveis intenção de compra, sexo e idade, e apreciação global, sexo e idade. Relativamente à associação entre apreciação global e intenção de compra, como esperado, revelou-se significativa, com uma confiança de 95%, o que significa que uma elevada apreciação global corresponde a uma muito provável, ou certa, intenção de compra.

Ainda sobre a análise sensorial das primeiras formulações, foi pedido aos consumidores que fizessem sugestões para melhoria do produto. As grandes sugestões foram a diminuição do açúcar e o aumento da intensidade do sabor a microalga, o que levou à diminuição em 20% do açúcar na segunda formulação, bem como à duplicação do volume de concentrado de biomassa.

Após produção das segundas formulações, procedeu-se à segunda prova, que se realizou recorrendo a uma amostra de 41 indivíduos, de ambos os sexos. Os atributos avaliados no gelado mostraram-se na **Tabela 3.14**, recorrendo aos valores médios dos resultados.

Tabela 3.14 - Valores médios \pm DP dos resultados da análise sensorial hedónica às segundas formulações de gelado concebidas (N2 – gelado de nata controlo com redução de 20% de açúcar; C2 – gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *C. vulgaris* e redução de 20% de açúcar; P2 – gelado de nata com incorporação de 20 mL de biomassa de *P. purpureum* e redução de 20% de açúcar); avaliação dos atributos dos gelados confeccionados; As letras diferentes (a – b) em cada coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey, quando analisando determinado atributo avaliado na análise sensorial da formulação de gelados.

	Aspetto	Cor	Cheiro	Textura	Sabor	Apreciação Global
N2	7.9 \pm 1.0 ^a	7.7 \pm 1.3 ^a	7.1 \pm 1.5 ^a	7.8 \pm 0.9 ^a	7.5 \pm 1.5 ^a	7.6 \pm 1.1 ^a
C2	7.8 \pm 1.0 ^a	7.8 \pm 1.0 ^a	6.5 \pm 1.4 ^a	7.7 \pm 1.1 ^a	7.7 \pm 1.5 ^a	7.6 \pm 1.1 ^a
P2	8.0 \pm 1.1 ^a	8.1 \pm 1.2 ^a	6.4 \pm 1.5 ^a	7.6 \pm 1.2 ^a	7.7 \pm 1.4 ^a	7.6 \pm 1.2 ^a

De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que estes variam entre 6 e 8, o que corresponde a “Gosto pouco”, “Gosto moderadamente” e “Gosto muito”, respetivamente. À semelhança da primeira prova hedónica, a variável “cheiro” foi a que obteve menor pontuação, podendo dever-se à presença do cheiro característico da biomassa microalgal. A formulação controlo voltou a ter uma boa avaliação, mostrando que a receita do produto é da satisfação dos consumidores, e voltou a verificar-se que a formulação contendo biomassa de *P. purpureum* é a que mais agrada. Aplicado o teste ANOVA aos atributos em avaliação, verificando também se o aumento do volume de biomassa incorporado satisfazia o gosto do consumidor, não se apuraram diferenças significativas para o nível de confiança de 95% ($p \leq 0.05$). Este resultado mostra que a adição de um maior volume de concentrado de biomassa não levou à alteração dos atributos produto alimentar, mantendo uma boa perceção destes por parte dos consumidores.

A avaliação dos atributos das formulações de gelado desenvolvidas permitiu criar um perfil sensorial para cada uma destas, que se encontra no **Figura 3.7-B** e na **Figura 6.3** do **Anexo 3**, onde é possível verificar que são muito semelhantes entre eles.

Em relação à avaliação feita à intenção de compra destes produtos, realizada na prova, é possível observar na **Tabela 3.15** a igualdade de resultados entre as formulações C2 e P2.

Tabela 3.15 - Valores médios \pm DP dos resultados da intenção de compra das segundas formulações de gelado concebidas (N2 – gelado de nata controlo com redução de 20% de açúcar; C2 – gelado de nata com incorporação de 10 mL de biomassa de *C. vulgaris* e redução de 20% de açúcar; P2 – gelado de nata com incorporação de 20 mL de biomassa de *P. purpureum* e redução de 20% de açúcar).

N2	C2	P2
3.0 \pm 0.9 ^a	3.2 \pm 0.8 ^a	3.2 \pm 0.8 ^a

Verifica-se que os três resultados correspondem ao nível de avaliação 3, isto é, “Provavelmente compraria”, tal como ocorrido na análise das primeiras formulações, sendo um resultado positivo para um novo produto alimentar que incorpora biomassa proveniente de microalgas. Através da comparação dos resultados, testando-os recorrendo ao teste ANOVA, comprovou-se que, para o nível de confiança de 95% ($p \leq 0.05$), não existem diferenças significativas entre formulações. Assim, comparando com a formulação controlo, o impacto da adição de microalgas não é estatisticamente significativo para alterar a intenção de compra dos consumidores apesar de, estudando a **Tabela 3.15**, se verificar que a intenção de compra é superior nos gelados contendo microalgas.

As associações estatísticas da influência do sexo e idade na apreciação global e intenção de compra, bem como a influência da apreciação global na intenção de compra foram realizadas com recurso ao *software* ERZ ®. Estas associações revelaram, novamente, que não há evidência de associação, com uma confiança de 95% ($p \leq 0.05$), entre as variáveis intenção de compra, sexo e idade, e apreciação global, sexo e idade. Mais uma vez, a associação entre apreciação global e intenção de compra, como esperado, revelou-se significativa, com uma confiança de 95%, o que traduz a influência de uma elevada apreciação global na intenção de compra, tornando-a muito provável ou certa.

À semelhança da análise sensorial das primeiras formulações, também foi pedido aos consumidores que fizessem sugestões para melhoria do produto. As grandes sugestões foram a diminuição do

açúcar nas três formulações, revelando que a diminuição em 20% do açúcar não foi suficiente, diminuição da intensidade do sabor na formulação C2, bem como tornar a cor mais apelativa, intensificação do sabor na formulação P2, bem como da cor da mesma. Estas sugestões suportam a ideia de que a formulação que incorpora *Porphyridium purpureum* é a que mais agrada os consumidores, não se notando um impacto significativo no sabor desta, ao mesmo tempo que revelam que o aumento do volume de concentrado de biomassa de *Chlorella vulgaris* não foi do agrado de todos os inquiridos, tendo, ainda, exercido um efeito na cor que aparentemente a tornou menos atrativa.

Uma vez que a amostra de indivíduos variou de um momento de prova para o outro, não é correto comparar estatisticamente os resultados das duas provas. No futuro, seria interessante avaliar estatisticamente as diferenças entre as várias provas hedônicas, de modo a verificar se existem diferenças significativas entre os resultados, quando comparando as duas formulações.

4. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho justifica-se pelo crescente interesse pelas microalgas e as suas propriedades nutritivas e benéficas para a saúde humana, bem como o aspeto inovador da sua incorporação em produtos alimentares. Existe, também, uma progressiva pressão sobre o mercado alimentar e, conseqüentemente, uma necessidade de inovação por parte desta indústria, nomeadamente na criação de produtos saudáveis e funcionais, que possam nutrir os consumidores e, ao mesmo tempo, reduzir o risco de determinadas doenças. Neste sentido, procurou-se aliar duas tecnologias muito presentes nos dias de hoje, incorporando microalgas numa receita de gelado, procurando obter um enriquecimento do produto, tornando-o funcional, mas continuando a ser organoleticamente apelativo.

O trabalho realizado permitiu estudar a tecnologia de produção de microalgas em ambiente controlado, bem como conhecer a composição química das espécies, *Chlorella vulgaris* e *Porphyridium purpureum*. Neste sentido conclui-se que se conseguiu atingir o objetivo, produzindo biomassa pura, rica em minerais, e com valores de macroconstituintes dentro dos valores descritos na literatura.

Relativamente à incorporação da biomassa microalgal nas formulações de gelado, esta provou ser uma mais-valia em termos nutricionais, particularmente no que toca à concentração de elementos minerais presentes, sendo o efeito a nível dos macroconstituintes muito ligeiro. As análises realizadas permitiram concluir que a adição da biomassa de *C. vulgaris* e *P. purpureum* enriqueceu o elevado teor mineral do produto, podendo alegar que se trata de um produto alimentar com alto teor de minerais como cálcio, potássio, fósforo e cloro, segundo o regulamento (EU) nº 1924/2006 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2007) e o regulamento (EU) nº 1169/2011 (Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, 2011). Relativamente aos macroconstituintes, não houve alterações significativas no produto, verificando-se um ligeiro aumento do açúcar nas formulações com biomassa microalgal e uma diminuição do teor lipídico. Apesar do aumento do teor em açúcares não se ter provado significativo estatisticamente, o produto possui uma elevada quantidade de açúcar que, para atingir em pleno os objetivos de um produto funcional mais saudável, deverá ser reduzida. Uma vez que a quantificação do teor em lípidos e em proteínas não foi realizada em triplicado, não foi possível analisar estatisticamente os seus resultados.

Além dos resultados a nível de constituição bioquímica, a adição de biomassa proveniente de microalgas alterou a cor do produto, tal como era esperado devido às conhecidas propriedades corantes das mesmas, o que tornou o produto mais interessante e apelativo ao consumidor.

A análise sensorial hedónica permitiu concluir que os consumidores (43 indivíduos na primeira prova, de ambos os sexos (F = 46.51% e M = 53.49%), com idades compreendidas entre os 18 e os 54 anos, e uma média de idades \bar{x} = 25.77 anos; 41 indivíduos na segunda prova, de ambos os sexos (F = 63.41% e M = 36.59%), com idades compreendidas entre os 18 e os 63 anos, e uma média de idades \bar{x} = 30.02 anos) estão recetivos a este género de produtos inovadores, bem como interessados nos mesmos devido aos possíveis benefícios que podem aportar. Este interesse não tem influência do sexo nem da idade, como se comprovou após análise de resultados, e avaliação global variou entre “Gosto Moderadamente” e “Gosto Muito”, sendo esta, também, a avaliação de todos os atributos das várias formulações. Apenas o parâmetro “cheiro”, nas formulações C2 e P2, recebeu uma avaliação mais baixa, nomeadamente “Gosto Pouco”, o que traduz que a alteração no cheiro do pro-

duto, devido ao aumento de biomassa incorporada, não foi do agrado dos consumidores. O interesse dos consumidores também se revelou na intenção de compra, sendo esta, em todas as formulações, “Provavelmente compraria”, levando à conclusão que o desenvolvimento deste tipo de produtos é viável, mas deve ter em conta que existem muito poucas espécies de microalgas autorizadas para consumo (apenas *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira – Spirulina*), e que a *Porphyridium purpureum* não é uma delas, apesar de existir literatura científica na área que apresenta esta espécie como uma microalga sem produção de toxinas. Também é de realçar que os perfis sensoriais das seis formulações desenvolvidas mostraram-se muito semelhantes, o que reforça a ideia de que o produto foi bem recebido junto dos consumidores, não se notando diferenças significativas entre gelado controlo e gelado contendo biomassa proveniente de microalgas. Reforça-se a ideia de que os consumidores não preferem, nem rejeitam, o novo produto alimentar apresentado, o que pode significar um potencial caminho para o aperfeiçoamento da receita e introdução no mercado.

É possível concluir que o objetivo principal deste trabalho, ou seja, o desenvolvimento de um gelado com características funcionais à base de microalgas, pode, ou não, ter sido atingido, uma vez que a definição de alimento funcional ainda é discutível. Embora não haja qualquer alteração significativa nos macroconstituintes, foi comprovado o enriquecimento mineral nas formulações contendo biomassa microalgal. Indo de encontro à proposta apresentada pela FUFOS, pode considerar-se que as formulações desenvolvidas poderiam incluir-se na definição “alimentos nos quais um ou vários componentes foram modificados, substituídos, ou aperfeiçoados, para melhorar as propriedades benéficas” (European Commission, 2010), uma vez que os elementos minerais presentes possuem comprovados benefícios para a saúde. É de ressaltar que, segundo os valores recomendados de nutriente, as formulações controlo já possuem um alto teor em minerais, o que pode levar a que o enriquecimento por parte da incorporação de microalgas não seja considerado uma característica funcional. Ainda assim, a composição dos gelados produzidos tem potencial para ser uma formulação funcional, mas carece de revisão, dado que possui um elevado teor em açúcares e, no caso das formulações que incorporam biomassa microalgal, valores recomendados de nutrientes acima do estipulado.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Este estudo poderá ser continuado, considerando o método de adição de biomassa microalgal, procurando um que permita a incorporação desta sem alteração no cheiro do produto final, como a incorporação de biomassa em nanopartículas. É importante realçar o facto de que é necessário controlar o teor mineral do produto, de forma a enriquecê-lo mas não ultrapassar os valores recomendados nutricionalmente.

Seria interessante testar a junção de outros sabores, criando novas formulações de gelado, que se mostrassem apelativas ao consumidor, bem como inovadoras no mercado. A posição deste produto alimentar no mercado deveria ser estudada, uma vez que se pode apresentar como um complemento mineral à alimentação, que deve ser ingerido doseadamente. Provavelmente seria mais direccionado para consumidores que procuram produtos inovadores na área das sobremesas, bem como na área de “produtos saudáveis” e suplementos minerais.

Deveria ser feita uma análise ao perfil de ácidos gordos das várias formulações de gelado, de modo a verificar se existiu aumento de ácidos gordos polinsaturados, fornecidos pelas microalgas, e de modo a melhor entender a diminuição do teor lípico do produto. A quantificação dos macronutrientes também deveria ser reforçada, de modo a poder realizar uma análise estatística robusta aos resultados.

Poderia, também, ser feita uma avaliação reológica aos gelados criados, por forma a aferir se a adição de biomassa interfere na mesma, e ao tempo de prateleira pela mesma razão. Juntando a estas análises, também seria proveitoso fazer análises microbiológicas.

Este novo produto alimentar também poderia ser submetido a novas provas de análise sensorial, nomeadamente descritiva, para receber uma avaliação por parte de provadores treinados, bem como uma nova prova hedónica com uma maior amostra de indivíduos, por forma a realizar um teste de mercado.

A espécie *Porphyridium purpureum* revelou-se muito interessante ao longo de todo o trabalho, particularmente a sua incorporação no gelado, visto não ter qualquer impacto a nível de cheiro e sabor. Os seus resultados da análise aos elementos minerais também suscitaram grande curiosidade e, por isso, considera-se que poderia ser uma mais-valia continuar a estudar esta microalga.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402–3410.
- Anjo, D. F. C. (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, 3(2), 145-154.
- Arad, S. M., Yaron, A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology*, (3), 92–97.
- ASAE. (2009). Conservação dos alimentos, 14–15.
- Assunção, M. F., Varejão, J. M., Santos, L. M. (2017). Nutritional characterization of the microalga *Ruttenbergia lamellosa* compared to *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, 26, 8-14.
- Babu, M. S. H., Shams, S. (2013). Factors Influencing Consumers' Choice of Ice-Cream: a Study on Impulse Buying Behavior. *Journal of Marketing*, 16(1).
- Batista, A. P., Bandarra, N., Raymundo, A., Gouveia, L. (2007). Microalgae biomass—a potential ingredient for the food industry. In *EFFoST/EHED Joint Conference*.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Nunes, M. C., Franco, J. M., Raymundo, A. (2008). Microalgae biomass as a novel functional ingredient in mixed gel systems. In & G. O. P. P. A. Williams (Ed.), *Gums and stabilisers in the food industry* (Vol. 14, pp. 487–494). RSC Publishing.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164–173.
- Batista, A. P., Nunes, M. C., Fradinho, P., Gouveia, L., Sousa, I., Raymundo, A., Franco, J. M. (2012). Novel foods with microalgal ingredients - Effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of *Spirulina* and *Haematococcus* gels. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 182–189.
- Batista, A. P., Nunes, M. C., Raymundo, A., Gouveia, L., Sousa, I., Cordobés, F., Guerrero, A., Franco, J. M. (2011). Microalgae biomass interaction in biopolymer gelled systems. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 817–825.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. *Handbook of Microalgal Culture*, 312, 351.
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M. E., Van Loey, A. M. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research*, 32(March), 150–161.
- Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. (2006). *Bioactive marine natural products*. Springer Science & Business Media. Retrieved from books.google.com
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009). Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205.
- Bligh, E., Dyer, W. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production,

processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.

Buyck, J., Baer, R., Choi, J. (2011). Effect of storage temperature on quality of light and fullfat ice cream. *American Dairy Science Association*, 94, 2213–2219.

Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81.

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., Sinigaglia, M. (2014). Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(6), 1192-1206.

Costa, J. A. V., de Moraes, M. G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102(1), 2–9.

Costa, J. A. V., Radmann, E. M., Cerqueira, V. S., Cristina, G. (2006). PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS *Chlorella vulgaris* E *Chlorella minutissima* CULTIVADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. *Alim. Nutr*, 17, 429–436.

Dawczynski, C., Schäfer, U., Leiterer, M., ahreis, G. (2007). Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(25), 10470-10475.

de Mello-Sampayo, C., Corvo, M. L., Mendes, R., Duarte, D., Lucas, J., Pinto, R., Batista, A. P., Raymundo, A., Silva-Lima, B., Bandarra, N. M., Gouveia, L. (2013). Insights on the safety of carotenogenic *Chlorella vulgaris* in rodents. *Algal Research*, 2(4), 409–415.

de Moraes, M. G., da Silva Vaz, B., Etiele Greque, de M., Vieira Costa, J. A. (2015). Review Article Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*, 2015, 1–15.

de Noronha, J. F. (2003). Análise Sensorial - Metodologia.

Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A., Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 169–177.

Drake, M. (2007). Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. *American Dairy Science Association*, 90, 4925–4935.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1–25.

Euromonitor. (2009). Functional foods: a world survey. *Euromonitor international*, London. *Functional Times, Food Business, February*, 35. 6 p.

European Comission. (2010). Functional Foods. *Studies and reports*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. [ISBN 978-92-79-14239-0].

Feller, R., Matos, A. P., Moecke, E. H. S., Carvalho, R. M., Lopes, R. G., Camargo, C. P. A., Sant'Anna, E. S., Derner, R. B., Oliveira, J. V., Furigo, A. (2014). Comparative study of biochemical composition of five microalgae for biodiesel/bioproducs application. *Xx Congresso Brasileiro de*

Engenharia Química, 1–8.

Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1656–1664.

Fuentes, M. R., Fernández, G. A., Pérez, J. S., Guerrero, J. G. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345–353.

Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J. (2002). Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: Preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50(2–3), 179–187.

Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., Melis, A. (2000). Microalgae: A green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18(12), 506–511.

Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-moriah, U. A., Shany, S., Rosenshtrauch, A., Arad, S. M. (2000). Chickens Fed with Biomass of the Red Microalga *Porphyridium* sp. Have Reduced Blood Cholesterol Level and Modified Fatty Acid Composition in Egg Yolk. *Journal of Applied Phycology*, 12(VIdl), 325–330.

Glow, T. H. (n.d.). SCIENCE FOCUS : Fluorescence.

Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., Raymundo, A. (2007). *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3), 433–436.

Gouveia, L., Empis, J. (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(2), 227–233.

Gouveia, L., Marques, A. E., Sousa, J. M., Moura, P., Bandarra, N. M. (2010). Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(2), 21–37.

Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I., Empis, J. (2006). *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 362–367.

Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57(2), 157–163.

Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292–302.

Helrick, K. (1990). Official methods of analysis. sec. 33.2.11, Method 991.20. AOAC.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. A., Ibañez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43(2), 67–83.

Hoebler, C., Barry, J. L., David, A., Delort-Laval, J. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(2), 360–367.

Honkanen, P. (2009). Consumer acceptance of (marine) functional food. *Marine Functional Food*,

1, 141-154.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621–639.

Instituto Português da Qualidade. (2008). Norma Portuguesa NP 3293 - 2008. Gelados alimentares e misturas embaladas para congelar. Definição, classificação, características, embalagem, conservação e rotulagem, 1–8.

Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *Journal of Separation Science*, 28(16), 2111-2119.

Karemore, A., Pal, R., Sen, R. (2013). Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. *Algal Research*, 2(2), 113–121.

Kavitha, M. D., Seema Shree, M. H., Vidyashankar, S., Sarada, R. (2016). Acute and subchronic safety assessment of *Porphyridium purpureum* biomass in the rat model. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1071–1083.

Klein, B. C., Walter, C., Lange, H. A., Buchholz, R. (2012). Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1133–1139.

Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., Pehu, E. (2006). Health Enhancing Foods. Opportunities for Strengthening the Sector in Developing Countries. Agriculture and Rural Development. *The World Bank* (pp. 1-33). Discussion Paper 30.

Lawless, H., Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food: principles and practices* (2nd ed.). New York, USA: Springer.

Lee, R. E. (2008). *Phycology* (4th ed.). Cambridge, England: NewYork: Cambridge University Press.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2005). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2, 171–178.

Lidon, F. J. , Silvestre, M. M. (2007). *Indústrias Alimentares , Aditivos e Tecnologia*. (E. Editora, Ed.). [ISBN 978-972-592-203-3].

Lidon, F. J., Silvestre, M. M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. (E. Editora, Ed.). [ISBN 978-972-592-270-5].

Lordan, S., Ross, R. P., Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*, 9(6), 1056-1100.

Loskotova, J. (n.d.). How to choose the right color tolerancing method for your process?. Retrieved August 5, 2018, from <https://gqsystems.eu/blog/how-choose-the-right-color-tolerancing-method-for-your-process>

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Readings*, 193(1), 265–275.

Makinen-Aakula, M. (2006). Trends in functional foods dairy market. In *Proceedings of the third functional food net meeting*.

Mark-Herbert, C. (2004). Innovation of a new product category - Functional foods. *Technovation*, 24(9), 713–719.

Marktest, G. (2017). Mais de dois terços da população referem ter consumido gelados. Retrieved August 9, 2018, from <https://www.marktest.com/wap/a/n/id~2298.aspx>

Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206–210.

Martins, F., Pinho, O., Ferreira, I. (2004). Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação.

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.

Matos, Â. P., Feller, R., Moecke, E. H. S., de Oliveira, J. V., Junior, A. F., Derner, R. B., & Sant'Anna, E. S. (2016). Chemical Characterization of Six Microalgae with Potential Utility for Food Application. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(7), 963–972.

Monar, J. (2007). The Spanish functional food market: Present and future perspectives. In Functional FoodNet (FFNet) network meeting, IATA-CSIC.

Morais, M. G. De, Vaz, B. D. S., Moraes, E. G. De, Costa, J. A. V. (2014). Biological Effects of Spirulina (Arthrospira) Biopolymers and Biomass in the Development of Nanostructured Scaffolds. *BioMed Research International*, 2014.

Morris, H. J., Carrillo, O. V., Almarales, Á., Bermúdez, R. C., Alonso, M. E., Borges, L., Quintana, M. M., Fontaine, R., Ilauradó, G., Hernández, M. (2009). Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with the potentialities in immunonutrition. *Biotechnologia Aplicada*, 26(2), 162–165.

Ninfa, A. J., Ballou, D. P., Benore, M. (1998). *Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology*. Bethesda: MD: Fitzgerald Science Press.

Oliveira, M. N., Sivieri, K., Alegro, J. H. A., Saad, S. M. I. (2002). Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(1), 1-21.

Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2007). Rectificação ao Regulamento (CE) n.º 1924/2006. *Jornal Oficial Da União Europeia*.

Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2011). REGULAMENTO (UE) N.º 1169/2011 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 25 de Outubro de 2011. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2011, 18–63.

Patel, A. R. (2017). Probiotic fruit and vegetable juices-recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*, 24(5), 1850-1857.

Pessoa, M. F. (2018a). DETERMINAÇÃO DA COR EM ALIMENTOS. *MATÉRIAS-PRIMAS ALIMENTARES*.

Pessoa, M. F. (2018b). ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X.

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(8), 781–796.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G. G. B., Herrero, M., Señoráns, F. J., Ibáñez, E. (2010).

Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 450–455.

Porto, A., Oliveira, L. (2007). *Tabela da Composição de Alimentos*. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Editorial do Ministério da Educação. [ISBN 978-972-8643-19-5].

Pszczola, D. E. (2008). Sniffing out emerging ingredients. *Food technology*.

Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648.

Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. (2007). Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52(06), 237–292.

Raymundo, A., Gouveia, L., Batista, A. P., Empis, J., Sousa, I. (2005). Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Research International*, 38(8–9), 961–965.

Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34, S105-S110.

Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga.

Román, R. B., Álvarez-Pez, J. M., Fernández, F. G. A., Grima, E. M. (2002). Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 73–85.

Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J., Avissar, Y. (2017). Studying Cells. In *Biology* (p. 104). Houston, Texas: Rice University.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.

Shah, N., Prajapati, J. B. (2014). Effect of carbon dioxide on sensory attributes, physico-chemical parameters and viability of Probiotic *L. helveticus* MTCC 5463 in fermented milk. *Journal of food Science and Technology*, 51(12), 3886-3893.

Sanders, M. E. (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 341-347.

Sekar, S., Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113–136.

Singh, A., Nigam, P. S., Murphy, J. D. (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102(1), 10–16.

Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.

Sloan, A. E. (2008). top 10 functional food trends. *Food technology*.

Soukulis, C., Lyroni, E., Tzia, C. (2010). Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1351–1358.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO) Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87–96.

Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 17(3), 215–222.

Tokusoglu, O. , Unal, M. K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68, 1144–1148.

Unilever. (n.d.). Valores nutricionais médios, Carte D'Or Nata. Retrieved July 20, 2018, from <http://www.partilhafelicidade.com/Products/ProductDetail.aspx/bid-836197/sid-317799/pid-303820>

USEPA, E. (1998). Method 1664, Revision A: N-hexane extractable material (HEM; oil and grease) and silica gel treated N-hexane extractable material by extraction and gravimetry. Federal Register (Vol. 64). Washington DC: United States: U.S. *Environmental Protection Agency*.

Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. M. (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology*, 135, 142–149.

Vaz, B. da S., Moreira, J. B., Morais, M. G. de, Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7(2016), 73–77.

Vieira, J. (2011). Fundamentos da Colorimetria, 19–58.

Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., & Vega, J. M. (2011). Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, 9(3), 319–333.

Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. (2010). Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(3), 287–295.

Wildman, R. E. (2002). Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC press.

Xia, L., Ge, H., Zhou, X., Zhang, D., Hu, C. (2013). Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. *Bioresource Technology*, 144, 261–267.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Tabela 7.1 - Tabela descritiva de todos os reagentes utilizados ao longo do trabalho, respetiva pureza e marca.

Reagente	Pureza	Marca
Ácido bórico (a)	p.a.	Merck
Ácido bórico (b)	>99.5%	Fluka
Ácido sulfúrico	95.0-97.0%	Honeywell Fluka
Ácido sulfúrico concentrado	95.0-97.0%	Fluka
Albumina bovina sérica	≥99.0%	Fluka
Azul metileno	p.a.	Merck
Bicarbonato de sódio	>99.0%	Solvey
Carbonato de sódio anidro	p.a.	Panreac
Cloreto de cálcio	99.5%	Scharlau
Cloreto de manganês	99.0-101.0%	Merck
Cloreto de sódio	≥99.0%	Carlo Erba
Clorofórmio	90.0%	Lab-Scan
EDTA disódico	99.0-101.0%	Sigma-Aldrich
Etanol	99.9%	Carlo Erba
Fenol	99.0-100.5%	Sigma-Aldrich
Fosfato monopotássico	99.5%	Merck
Glucose anidra	99.5%	Sigma-Aldrich
Hexano	≥99.0%	Sigma-Aldrich
Heptamolibdato de amónia	99.0%	Merck
Hidróxido de sódio	p.a.	Akzonobel Eka
Metanol	99.8%	Fluka
Molibdato de sódio	99.0%	Fluka

Nitrato de potássio	99.0%	Fluka
Óxido de mercúrio	≥99.0%	Merck
Reagente Folin-Ciocalteu's	p.a.	Panreac
Sacarose	≥99.0%	Merck
Sulfato de cobre II pentahidratado	99.0-100.5%	Pronolab
Sulfato de cobre	99.0%	Fluka
Sulfato de ferro	≥98.0%	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnésio	p.a.	Merck
Sulfato de manganês	99.0-101.0%	Merck
Sulfato de potássio	≥99.0%	Carlo Erba
Sulfato de sódio anidro	99.0%	Merck
Sulfato de zinco	≥99.0%	Merck
Tartarato de sódio-potássio	p.a.	Panreac
Tiosulfato de sódio	99.5%	Riedel-de Haën
Tris-HCl (pH 7.6) 1M	p.a.	Sigma-Aldrich
Vermelho de metilo	p.a.	Panreac

Tabela 7.2 - Tabela descritiva de todos os equipamentos utilizados ao longo do trabalho, respetivo modelo e marca.

Equipamento	Modelo e Marca
Aagitador magnético	MC-B
Aagitador magnético	NORMAX
Aagitador magnético	11NCD, RSLAB
Aparelho de destilação	Distillation Unit K-350, Büchi
Aparelho de destilação de água	Nahita Blue
Aparelho de digestão	Digestion Unit K-424, Büchi
Autoclave	Newclave, HL-36AC
Balança de precisão	Mettler Toledo, AB204-S
Banho termoeestático	P-Selecta, Precistern
Banho termoeestático	Heating Bath B-490, Büchi
Batedeira	Chefette HM 680, KENWOOD
Bomba de aquário	STELLAR
Centrifugadora	Heraeus multifuge 35R+, Thermo Scientific
Centrifugadora	Hettich, Universal
Centrifugadora	2-6E Scartorius, Sigma
Colorímetro	Chroma Meter CR-400, Sensing Inc
Espetrofotómetro	Hitachi, U-200
Espetrofotómetro	Specord-50 PLUS, Analytikjena
Estufa	Memmert
Liofilizador	Heto PowerDry LL3000, Thermo Scientific
Máquina de gelados	Ice Cream & Yogurt Maker 630, Ariette
Microscópio	Optika Microscopes
Mufla	Nabertherm
Purificador de água	Elix S Progard 2, Millipore
Rotavapor	R110, Büchi

Vortex	6PRO, RSLAB
XRF	Niton™ XL3t XRF Analyzer, Thermo Scientific

ANEXO 2 – MEIOS DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS

Tabela 7.3 - Reagentes e respetiva concentração para elaboração do meio de cultura de *Chlorella vulgaris*.

Reagente	g/L (mL/L para soluções)
Bicarbonato de sódio	0.50
Cloreto de cálcio	0.11
E.T.CHU**	1.0 mL
Fe-EDTA*	10.0 mL
Fosfato monopotássico	1.25
Nitrato de potássio	1.25
Sulfato de magnésio	1.00

***Solução Fe-EDTA:**

2.78 g/L sulfato de ferro + 3.37 g/L EDTA disódico.

****Solução E.T.CHU:**

0.286 g/L ácido bórico (b) + .203 g/L sulfato de manganês + 0.022 g/L sulfato de zinco + 0.006 g/L molibdato de sódio + 0.005 g/L sulfato de cobre.

Tabela 7.4 - Reagentes e respetiva concentração para elaboração do meio de cultura de *Porphyridium purpureum*.

Reagente	g/L (mL/L para soluções)
Bicarbonato de sódio	0.04
Cloreto de cálcio	1.5
Cloreto de sódio	27.0
E.T.*	1 mL
Fe-EDTA	1 mL
Fosfato monopotássico	0.07
Sulfato de magnésio	6.6
Tris-HCl (pH 7.6) 1M	20 mL

***Solução E.T.:**

0.600 g/L ácido bórico + 0.400 g/L cloreto de manganês + 0.370 g/L heptamolibdato de amónia + 0.040 g/L cloreto de zinco + 0.040 g/L cloreto de cobre.

ANEXO 3 – SOLUÇÕES PRESENTES NOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE MACRO-CONSTITUINTES

Determinação do teor em proteínas – microalgas:

Solução 1: Carbonato de Sódio a 2.0 % em NaOH 0.1 N (1 L).

20 g bicarbonato de sódio + 100 mL hidróxido de sódio 1.0 N + 900 mL água.

Solução 2: Sulfato de cobre (II) pentahidratado a 0.5 % (100 mL).

0.5 g sulfato de cobre (II) pentahidratado + 100 mL água.

Solução 3: Tartarato de sódio-potássio a 1.0 % (100 mL).

1.0 g tartarato de sódio-potássio + 100 mL água.

Reagente A: Soluções 1 + 2 + 3 em proporção 100:1:1 respetivamente.

Reagente B: Reagente de Folin-Ciocalteu's em água na proporção 1:1.

Determinação do teor em lípidos – microalgas:

Solução monofásica: metanol/clorofórmio/água na proporção 2:1:0.8 (v/v/v).

Determinação do teor em proteínas – gelado:

Reagente de digestão: 134 g sulfato de potássio + 650 mL água + 200 mL ácido sulfúrico + 2 g óxido de mercúrio/25 mL ácido sulfúrico 6N.

Solução diluída a 1 L.

Solução mista de indicadores: 200 mg vermelho de metilo/100 mL etanol + 100 mg azul metileno/50 mL etanol.

Solução titulante padrão: 0.54 mL/L ácido sulfúrico (0.02 N).

ANEXO 4 – FICHA DE PROVA: ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA

FICHA DE PROVA DE ANÁLISE SENSORIAL HEDÓNICA

IDADE: GÉNERO: F M

DATA: AMOSTRA:

Instruções: Classifique os seguintes atributos de acordo com a escala apresentada:

1 - Desgosto Extremamente; 2 - Desgosto Muito; 3 - Desgosto Moderadamente;
4 - Desgosto Pouco; 5 - Indiferente; 6 - Gosto Pouco;
7 - Gosto Moderadamente; 8 - Gosto Muito; 9 - Gosto Extremamente.

Aspeto	Cor	Cheiro	Textura	Sabor

Apreciação Global

Intenção de compra: Classifique a sua intenção de compra de acordo com a escala apresentada:

1 – Não compraria de certeza; 2 – Provavelmente não compraria;
3 – Provavelmente compraria; 4 – Compraria de certeza.

Compraria este produto?

Tem alguma sugestão que permita a melhoria do produto?

Obrigada pela colaboração!

Figura 7.1 - Ficha de prova criada para análise sensorial hedónica das várias formulações desenvolvidas.

ANEXO 5 – PERFIL SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

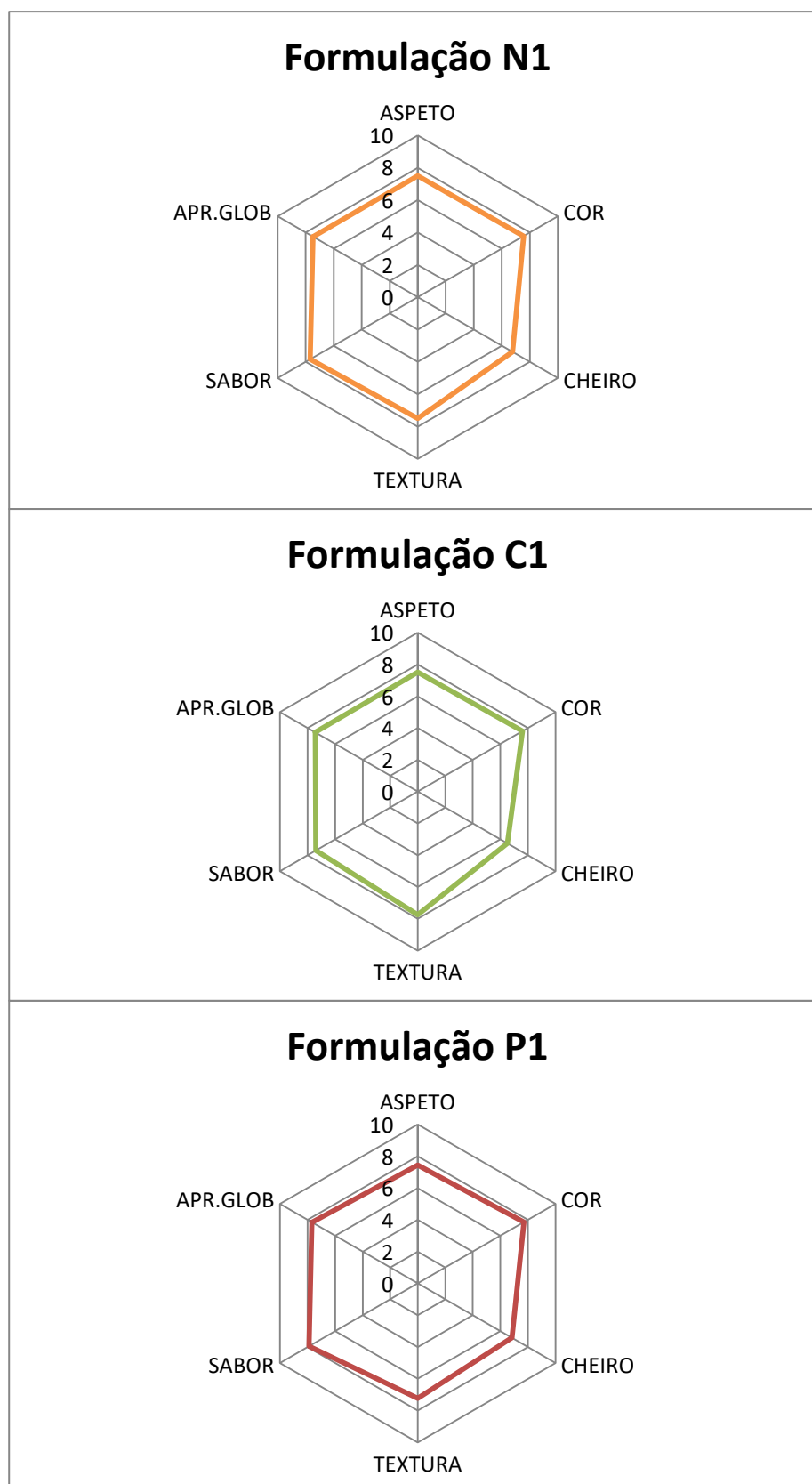


Figura 7.2 - Gráficos ilustrativos do perfil sensorial de cada uma das primeiras formulações desenvolvidas.

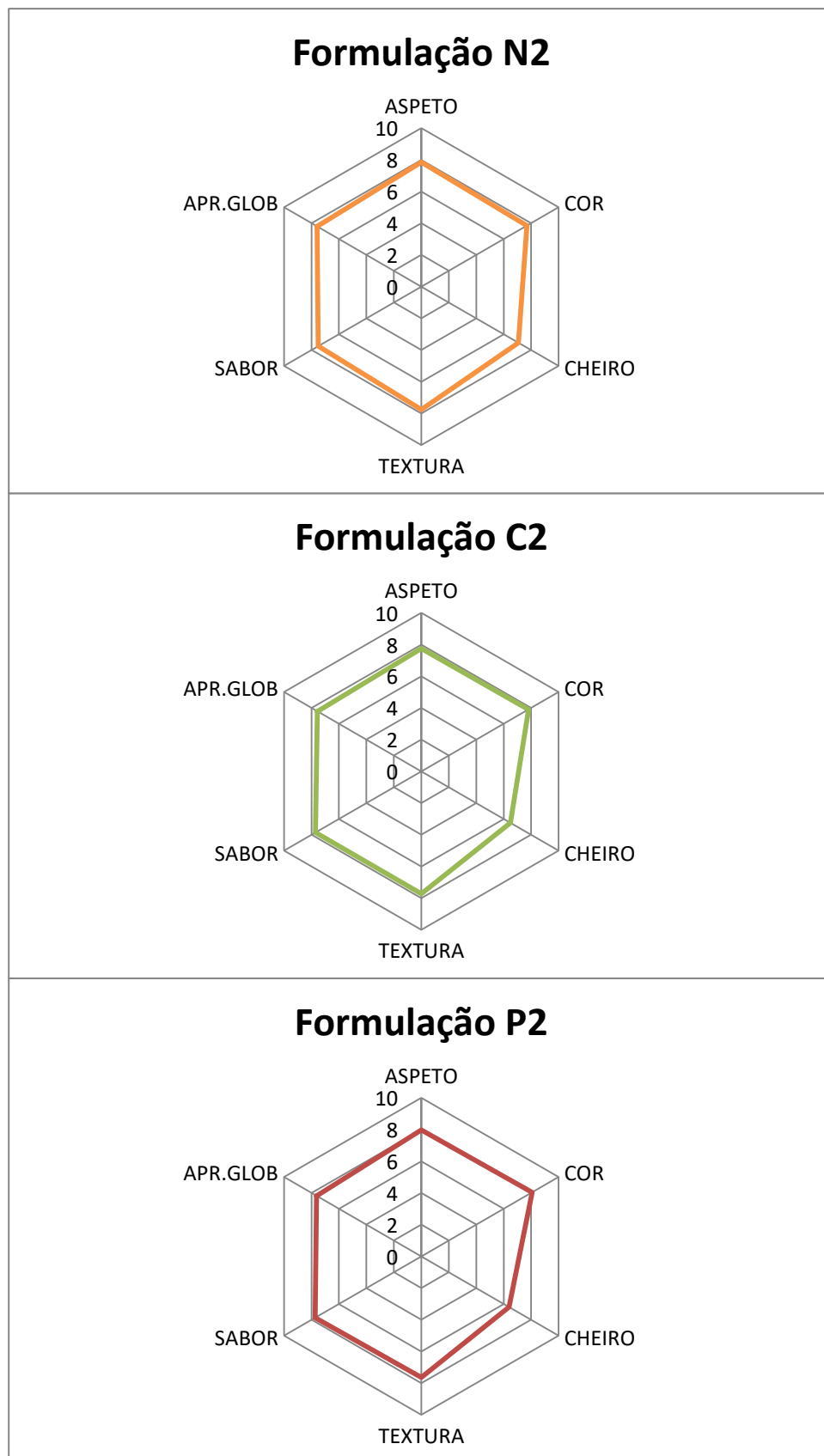


Figura 7.3 - Gráficos ilustrativos do perfil sensorial de cada uma das segundas formulações desenvolvidas.